

# TRASTORNOS DEL CICLO DE LA METILACIÓN EN PACIENTES CON FENILCETONURIA

Fdo.:.....

Olalla Elena López Suárez

Departamento de Pediatría

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015



## AUTORIZACIÓN DOS DIRECTORES DA TESE

Dña. M<sup>a</sup> Luz Couce Pico, Profesora do Departamento de Pediatría da Universidade de Santiago de Compostela (USC);

D. Luís Aldámiz-Echevarría Azuara, Profesor do Departamento Pediatría da Universidad del País Vasco (UPV/EHU),

D. José María Fraga Bermúdez, Catedrático de Pediatría da Universidade de Santiago de Compostela (USC);

Como Director/a/es/as da Tese de Doutoramento titulada «Trastornos del ciclo de la metilación en pacientes con fenilcetonuria»

Presentada por Dña. Olalla Elena López Suárez, Alumna do Programa de Doutoramento de Pediatría 2121-05-1V01 (RD 778).

*Autoriza a presentación da tese indicada , considerando que reúne os requisitos esixidos no artigo 34 do regulamento de Estudos de Doutoramento , e que como Director da mesma non incurre nas causas de abstención establecidas na lei 30/1992.*

Asdo. M<sup>a</sup> Luz Couce Pico

.....

Asdo. Luís Aldámiz-Echevarría Azuara

.....

Asdo. José M<sup>a</sup> Fraga Bermúdez

.....





## AGRADECIMIENTOS

*“Si yo pudiera enumerar cuánto debo  
a mis grandes antecesores y contemporáneos,  
no me quedaría mucho en propiedad”*

Goethe.

El camino hasta llegar aquí ha sido largo (mucho más largo de lo que sería prudente reconocer) y lleno de todos los recovecos, idas y venidas que caracterizan la vida de una persona corriente, que es lo que yo soy. Afortunadamente, nunca he estado sola, y a lo largo de todo este proceso he recibido el inestimable apoyo de muchas personas, intentaré no olvidarme de ninguna:

Gracias a mis directores de tesis, por haberme ofrecido esta oportunidad, por dedicarme tantas horas de su tiempo y por saber animarme cuando más lo necesitaba.

Gracias a todos mis compañeros de la Unidad de Neonatología del CHUS, por su cariño, su comprensión, sus consejos y su trabajo, que es una parte del mío.

Gracias a todo el personal de los Laboratorios de Metabolopatías del CHUS y de Cruces, por su gran profesionalidad y porque sin su trabajo, esta tesis no sería posible. De forma especial gracias a ti, Fernando, por tu implicación y por estar siempre ahí.

Gracias a la mejor secretaria de Departamento que se puede tener; Montse, qué sería de nosotros sin ti.

Gracias a mi familia, que siempre confía en mí, aunque yo deje de hacerlo.

Gracias a todos mis amigos y amigas, que han sido infinitamente pacientes y que siempre están cuando los necesito.

Gracias Paulo, por ver en mí lo que yo no veo.

Esta tesis es tan mía como vuestra. Gracias, de corazón.



## **ABREVIATURAS**

**ADMA:** N-N-dimetil-L-arginina asimétrica.

**ADP:** adenosín bifosfato.

**AECOM:** Asociación española para el estudio de los errores congénitos del metabolismo.

**AGAT:** L-arginina-glicina amidinotransferasa.

**Ala:** alanina.

**Arg:** arginina.

**Asn:** asparagina.

**Asp:** ácido aspártico.

**ATP:** adenosín trifosfato.

**BBB:** barrera hematoencefálica.

**BHMT:** betaína: homocisteína metiltransferasa.

**BH<sub>4</sub>:** (6R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina.

**BH4db:** [www.bh4.org](http://www.bh4.org).

**Ca:** Calcio.

**CDR/RDA:** cantidad diaria recomendada.

**CEDEM:** Centro de diagnóstico de enfermedades moleculares.

**Citr:** Citrulina.

**Cr:** creatina.

**Crn:** creatinina.

**CSUR:** centro superior de unidad de referencia.

**Cys:** cisteína.

**DDAH 1 y 2:** dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1 y 2.

**DE:** derivación estándar.

**DGGE:** electroforesis de gel de gradiente de desnaturalización.

**DHPR:** dihidropterina reductasa.

**DNA/ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**EDTA:** ácido etilen-diamino-tetra-acético.

**ELISA:** enzimoimmunoanálisis competitivo.

**EMH:** enfermedad metabólica hereditaria.

**F:** femenino.

**GAA:** guanidinoacetato.

**GAMT:** guanidinoacetato metiltransferasa.

**GC-MS:** cromatografía de gases-espectrometría de masas.

**GEMO:** gliceril-éter monooxigenasa.

**GGT:** gamma glutamil transpeptidasa.

**Gln:** glutamina.

**Glu:** ácido glutámico.

**Gly:** Glicina.

**GMP:** glucomacropéptido.

**GOT/AST:** aspartato aminotransferasa.

**GPT/ALT:** alanina aminotransferasa.

**GTP:** Guanosina trifosfato.

**GTPCH:** guanosín-trifosfato-ciclohidrolasa.

**Hcy:** homocisteína.

**HDL:** lipoproteína de alta densidad.

**5HIA:** ácido 5 hidroxí-indol-acético.

**His:** histidina.

**HMV:** ácido homovanílico.

**HPA:** hiperfenilalaninemia.

**HPAB:** hiperfenilalaninemia benigna.

**HPLC:** cromatografía líquida de alta resolución.

**Hyl:** hidroxilisina.

**Hyp:** hidroxiprolina.

**ICD:** índice de control dietético.

**Ile:** isoleucina.

**IMC:** índice de masa corporal.

**IVA:** aciduria isovalérica.

**LAT 1:** L-aminoácido transportador 1.

**LC-MS/MS:** cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

**LCR:** líquido cefalorraquídeo.

**LDL:** lipoproteína de baja densidad.

**Leu:** leucina.

**LNAA:** aminoácidos neutros de gran tamaño (triptófano, tirosina, leucina, isoleucina, valina).

**L-NMMA:** N-monometil-L-arginina.

**Lys:** lisina.

**M:** masculino.

**MCbl:** metil-cobalamina.

**Met:** metionina.

**MLPA:** amplificación de sondas dependiente de ligandos.

**MMA:** ácido metilmalónico.

**MRM:** monitorización por reacción múltiple.

**mRNA/ARNm:** ácido ribonucleico mensajero.

**MS:** metionina sintetasa.

**MS/MS:** espectrometría de masas en tándem.

**MSR:** metionina sintetasa reductasa.

**MSUD:** enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce (maple syrup urine disease).

**MTHF:** metiltetrahidrofolato.

**MTHFR:** 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa.

**NADH:** nicotinamida adenina dinucleótido reductasa.

**NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

**NKH:** hiperglicemia no cetósica.

**NMDA:** N-metil-D-aspartato.

**NO:** óxido nítrico.

**NOS:** óxido nítrico sintetasa.

**ns:** no significativo.

**Orn:** Ornitina.

**PA:** acidemia propiónica.

**PAH:** fenilalanina 4-hidroxilasa.

**PAH:** gen que codifica la enzima fenilalanina hidroxilasa.

**PAHdb:** [www.pahdb.mcgill.ca](http://www.pahdb.mcgill.ca).

**PAL:** fenilalanina-amonio liasa.

**PCD:** Pterina-4  $\alpha$ carbinolamina dehidratasa.

**PCr:** fosfocreatina.

**Phe:** fenilalanina.

**PKU:** fenilcetonuria.

**PRMTs I y II:** S-adenosilmetionina N-metiltransferasa I y II.

**Pro:** prolina.

**PTS:** fosfoenolpiruvato proteína kinasa.

**q-BH2:** quinonoil dihidrobiopterina.

**RM o RMN:** resonancia magnética o resonancia magnética nuclear.

**SAH:** S-adenosilhomocisteína.

**SAM:** S-adenosilmetionina.

**SDMA:** dimetilarginina simétrica.

**Se:** selenio.

**Ser:** serina.

**SR:** siapterina reductasa.

**Tau:** taurina.

**Thr:** treonina.

**Trp:** triptófano.

**TRYH 1 y 2:** Triptófano hidroxilasa 1 y 2.

**TYH:** Tirosina hidroxilasa.

**Tyr:** tirosina.

**Val:** valina.

**Zn:** zinc.









## **RESUMEN**



## RESUMO

Neste traballo demostramos que os doentes con fenilketonuria (PKU) que seguen un tratamento dietético estrito, con escasos aportes de proteínas naturais e un alto aporte de suplementos dietéticos exentos de fenilalanina e enriquecidos en vitaminas e minerais, reciben unha cantidade excesiva de vitamina B<sub>12</sub> e de ácido fólico que leva a unha alteración no ciclo da metilación. Así, prodúcese un aumento na vía da remetilación, manifesto no descenso dos niveis de homocisteína, metionina, arxinina e citrulina, así como un aumento da trans-sulfuración (manifesto na elevación de cisteína, glicina e ornitina). Isto supón unha menor dispoñibilidade de grupos metilo para outras reaccións metabólicas; nós estudamos as relacionadas coa vía Arx-ADMA-NO e a vía Arx-GAA-Cr, comprobando que de feito existe unha menor produción de dimetilarxinina asimétrica (ADMA) e creatinina (Crn). A determinación destes metabolitos poderíase empregar para o control dietético dos doentes, o que no caso da Crn resulta especialmente importante, dada a rapidez e o baixo custo da súa determinación. Mentres algúns estudos previos suxeriran alteracións nestes metabolitos, ningún ata hoxe estudara a vía da metilación nos pacientes PKU nin a puxera en relación co tratamento dietético destes doentes.

**Palabras chave:** ácido fólico, fenilketonuria, metilación, tratamento dietético, vitamina B<sub>12</sub>.

## RESUMEN

En este trabajo demostramos que los pacientes con fenilketonuria (PKU) que siguen un tratamiento dietético estricto, con escasos aportes de proteínas naturales y alto aporte de suplementos dietéticos exentos de fenilalanina y enriquecidos en vitaminas y minerales, reciben una cantidad excesiva de vitamina B<sub>12</sub> y de ácido fólico que conlleva una alteración en el ciclo de la metilación. Así, se produce un aumento de la vía de la remetilación, que se pone de manifiesto en el descenso de los niveles de homocisteína, metionina, arginina y citrulina, así como un aumento de la trans-sulfuración (manifestada en la

elevación de cisteína, glicina y ornitina). Ello supone una menor disponibilidad de grupos metilo para otras reacciones metabólicas; nosotros hemos estudiado las relacionadas con la vía Arg-ADMA-NO y la vía Arg-GAA-Cr, comprobando que en efecto existe una menor producción de dimetilarginina asimétrica (ADMA) y creatinina (Crn). La determinación de estos metabolitos podría ser utilizada para el control dietético de los pacientes, lo que en el caso de la Crn es especialmente importante, dada la rapidez y el bajo coste de su determinación. Si bien estudios previos habían sugerido alteraciones en estos metabolitos, ninguno hasta la fecha había estudiado la vía de la metilación en los pacientes PKU ni la había puesto en relación con el tratamiento dietético de estos pacientes.

**Palabras clave:** ácido fólico, fenilketonuria, metilación, tratamiento dietético, vitamina B<sub>12</sub>.

## ABSTRACT

In this study we show that patients with phenylketonuria (PKU) who follow strict dietary treatment with a low intake of natural proteins and a high intake of phenylalanine-free dietary supplements enriched with vitamins and minerals have excessive vitamin B<sub>12</sub> and folic acid levels that lead to alterations in the methylation cycle. Alterations include increased remethylation, evidenced by reduced homocysteine, methionine, arginine, and citrulline levels, and increased trans-sulfuration, evidenced by elevated cysteine, glycine, and ornithine levels. The result of these changes is less availability of methyl groups for other metabolic reactions. We specifically studied reactions related to the Arg-ADMA-NO and the Arg-GAA-Cr pathways, and found lower production of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and creatinine (Crn). Measurement of these metabolites might therefore be of use for monitoring dietary treatment in patients with PKU. This possibility is particularly interesting in the case of creatinine, as testing is rapid and inexpensive. While previous studies have suggested that these metabolites are altered in PKU, ours is the first study to

analyze the methylation pathway in this setting and to link metabolic alterations to dietary treatment.

**Key words:** dietary treatment, folic acid, methylation, phenylketonuria, vitamin B<sub>12</sub>.







## **INDICE**





**ÍNDICE**

<b>1. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. FENILCETONURIA. DEFINICIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2. HISTORIA DE LA FENILCETONURIA. LOS INICIOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3. CONCEPTOS BÁSICOS .....</b>	<b>19</b>
2.3.1. Aminoácidos. Definición.....	19
2.3.2. Fenilalanina .....	20
<b>2.4. HIPERFENILALANINEMIA .....</b>	<b>20</b>
2.4.1. Concepto .....	20
2.4.2. Epidemiología.....	21
2.4.3. Fisiopatología .....	21
<b>2.5. DEFICIENCIA DE PAH. GENÉTICA .....</b>	<b>24</b>
<b>2.6. CLÍNICA .....</b>	<b>27</b>
<b>2.7. DIAGNÓSTICO .....</b>	<b>28</b>
2.7.1. Cribado .....	28
2.7.2. Confirmación Diagnóstica.....	30
2.7.3. Defectos del cofactor BH <sub>4</sub> .....	31
2.7.4. Sobrecarga de BH <sub>4</sub> .....	32
<b>2.8. CLASIFICACIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>2.9. TRATAMIENTO .....</b>	<b>36</b>
2.9.1. Dieta .....	36
2.9.2. Diclorhidrato de Sapropterina .....	38
2.9.3. Glucomacropéptido .....	39
2.9.4. Aminoácidos neutros de gran tamaño .....	40

2.10. EVOLUCIÓN DE LA PKU .....	42
2.11. HOMOCISTEÍNA Y CICLO DE LA METILACION .....	46
2.12. DIMETILARGININA ASIMÉTRICA (ADMA) .....	48
2.12.2. Óxido nítrico.....	50
2.12.3. Inhibición de la síntesis de óxido nítrico.....	51
2.12.4. Eliminación de ADMA .....	51
2.12.5. ADMA e Hiperfenilalaninemia.....	54
2.13. VÍA ARGININA-GUANIDINOACETATO-CREATINA .....	55
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	57
3.1. HIPÓTESIS CONCEPTUAL .....	59
3.2. HIPÓTESIS OPERATIVA .....	59
3.3. OBJETIVOS .....	59
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
4.1. VARIABLES DEL ESTUDIO .....	65
4.1.1. Variable principal.....	65
4.1.2. Variables secundarias.....	66
4.1.2.1. Antropometría.....	66
4.1.2.2. Variables de control de PKU - nutrición .....	67
4.1.2.3. Valoración de los trastornos de la vía Arg-ADMA-NO .....	68
4.1.2.4. Valoración de los trastornos de la vía Arg-GAA-Cr .....	69
4.1.2.5. Valoración bioquímica para completar el estudio del ciclo de la metilación .....	70
4.2. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS .....	70

<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>71</b>
<b>5.1. VIA METABOLICA DE LA HOMOCISTEINA.....</b>	<b>81</b>
<b>5.2. RUTAS METABOLICAS RELACIONADAS CON LA METILACIÓN .....</b>	<b>83</b>
<b>5.2.1. Vía Arg-ADMA-NO.....</b>	<b>83</b>
<b>5.2.2. Vía Arg-GAA-Creatina .....</b>	<b>86</b>
<b>5.3. CORRELACIONES .....</b>	<b>88</b>
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>93</b>
<b>6.1. ESTUDIO GENÉTICO .....</b>	<b>95</b>
<b>6.2. NUTRICIÓN Y DESARROLLO .....</b>	<b>97</b>
<b>6.3. METILACIÓN .....</b>	<b>102</b>
<b>6.4. MARCADORES DE CUMPLIMIENTO DIETÉTICO/SEVERIDAD .....</b>	<b>109</b>
<b>6.5. NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS .....</b>	<b>111</b>
<b>6.6. SESGOS Y LIMITACIONES.....</b>	<b>112</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>113</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>119</b>





## **1. JUSTIFICACIÓN**



## 1. JUSTIFICACIÓN

La hiperfenilalaninemia es un error innato del metabolismo que afecta a la ruta metabólica de la fenilalanina, la cual convierte la fenilalanina en tirosina a través del enzima fenilalanina 4-hidroxilasa y su cofactor (6R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). Esta patología provoca la acumulación de fenilalanina y sus metabolitos (los ácidos fenilpirúvico y feniláctico) en el cerebro, generando daños neurológicos severos e irreversibles en ausencia de tratamiento. Los fenotipos asociados a esta enfermedad varían desde la fenilcetonuria clásica a la hiperfenilalaninemia benigna.

Desde que fue descrito por primera vez en 1953 por Bickel, el tratamiento de la fenilcetonuria ha estado dirigido a disminuir los niveles de fenilalanina en el organismo, para lo cual a los pacientes se les prescribe una dieta limitada en proteína natural de alto valor biológico y, a la vez, suplementada con una mezcla sintética de aminoácidos exentos de fenilalanina, con la finalidad de alcanzar un aporte adecuado de proteínas, vitaminas, ácidos grasos esenciales y oligoelementos. En el caso de los pacientes afectos de hiperfenilalaninemia benigna, el tratamiento requiere una menor disminución de la ingesta de proteína natural y en la mayor parte de los casos, los pacientes pueden llevar una dieta casi normal y hacer un seguimiento de su patología menos estricto.

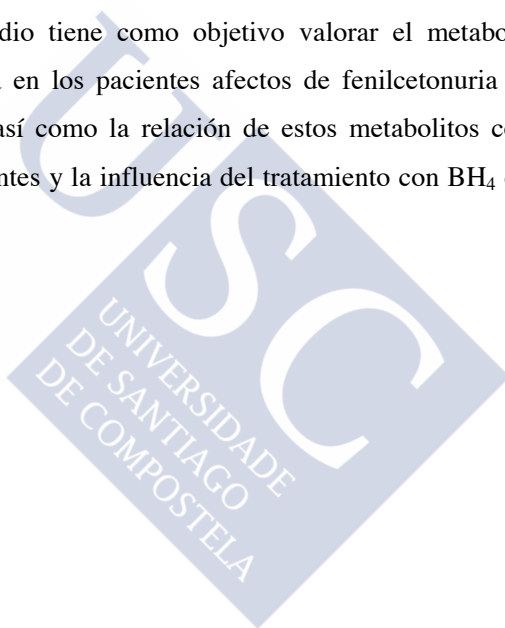
Los pacientes afectos de fenilcetonuria que siguen una dieta estricta pueden desarrollar trastornos nutricionales y déficits vitamínicos, entre ellos, de vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y ácido fólico. Por este motivo, los suplementos nutricionales que se aportan a estos pacientes están enriquecidos en estas vitaminas, ocasionando en muchos casos un aporte excesivo.

La restricción proteica y los niveles elevados de ácido fólico y de vitamina B<sub>12</sub> favorecen la remetilación de homocisteína a metionina y además, en la fenilcetonuria existe un incremento de la trans-sulfuración con aumento de la cisteína. Esta situación da lugar a una menor disponibilidad de grupos metilo para las vías metabólicas relacionadas con la metilación. Así, por un lado, la producción de dimetilarginina asimétrica (ADMA) se ve alterada, dando como

resultado menores niveles del mismo, y por otro lado, en la vía de la creatina, se produce una menor metilación del guanidinoacetato.

Aquellos pacientes que requieren un control nutricional más estricto, y por lo tanto una dieta más limitada en proteína natural y con un mayor aporte de suplementos de aminoácidos ricos en vitaminas del grupo B y ácido fólico, presentan con mayor frecuencia e intensidad las alteraciones en estas vías. En los pacientes respondedores al tratamiento con  $\text{BH}_4$ , al ser posible mejorar el aporte de proteínas naturales y permitir una disminución de los suplementos, mejora el ciclo de la metilación.

El presente estudio tiene como objetivo valorar el metabolismo de la metionina-homocisteína en los pacientes afectados de fenilcetonuria a través del ADMA y la creatina, así como la relación de estos metabolitos con el estado nutricional de los pacientes y la influencia del tratamiento con  $\text{BH}_4$  en estas vías metabólicas.







## **2. INTRODUCCIÓN**

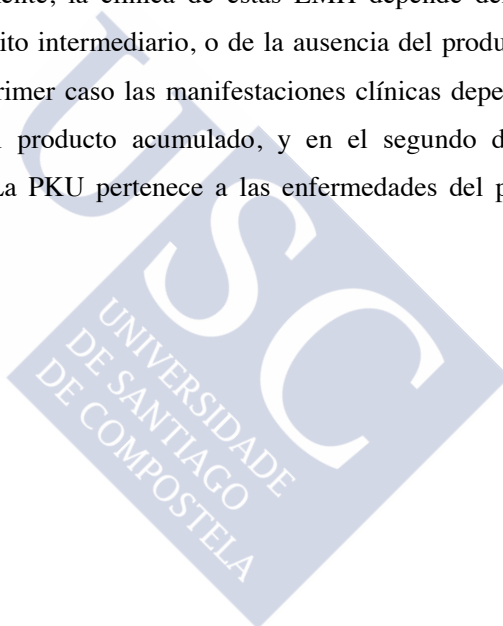


## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. FENILCETONURIA. DEFINICIÓN**

La fenilcetonuria (PKU) es una enfermedad metabólica hereditaria (EMH) de herencia autosómica recesiva (OMIM 261600, CIE-10 E70.0). El origen de todas las EMH se encuentra en una alteración del material genético, que conlleva un daño en el producto genético, la proteína/enzima, que a su vez se traduce en un cambio fenotípico.

Fisiopatológicamente, la clínica de estas EMH depende del exceso y/o acúmulo de un metabolito intermediario, o de la ausencia del producto que deja de sintetizarse. En el primer caso las manifestaciones clínicas dependerán de la potencial toxicidad del producto acumulado, y en el segundo del grado de toxicidad del mismo. La PKU pertenece a las enfermedades del primer grupo (Figura 1).



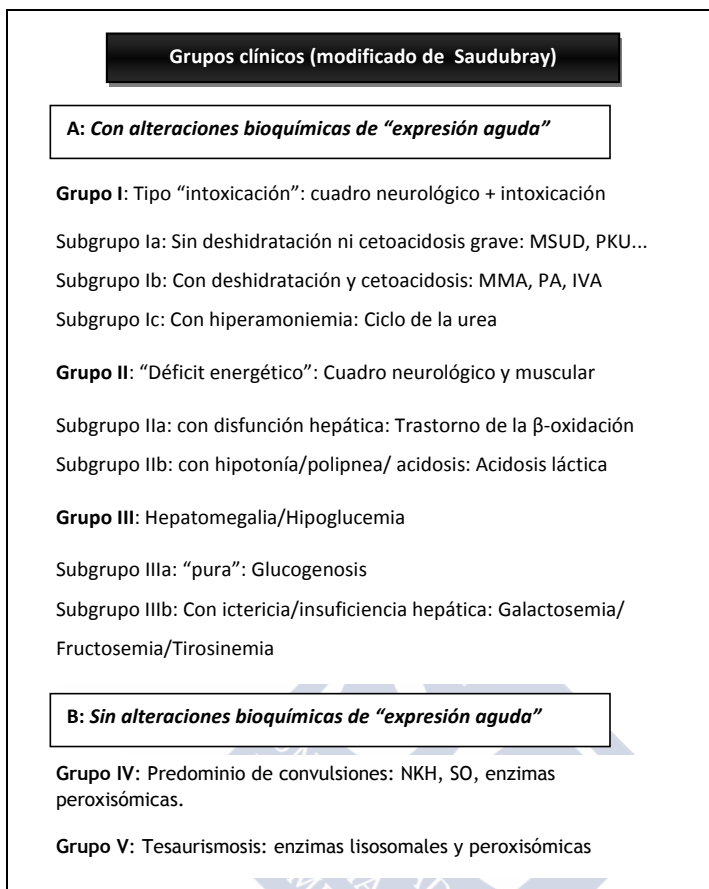


Figura 1. Clasificación de Saudubray de las enfermedades metabólicas hereditarias en el período neonatal.

La PKU se debe a un defecto en la enzima fenilalanina hidroxilasa (PAH, EC 1.14.16.1) catalizadora de la hidroxilación de fenilalanina (Phe) a tirosina (Tyr) (Figura 2).

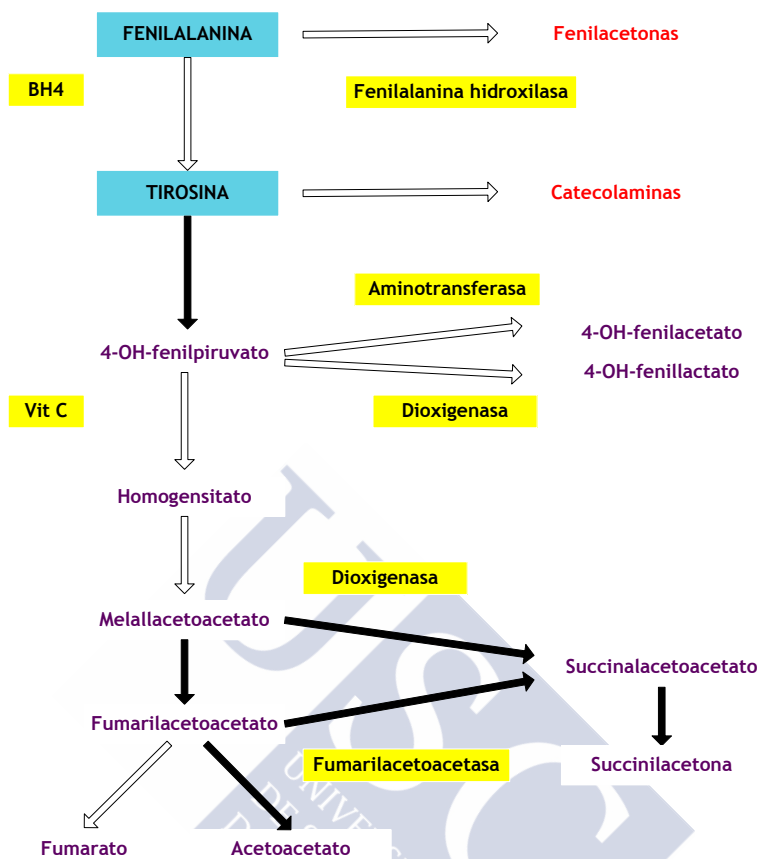


Figura 2. Metabolismo de la Fenilalanina y Tirosina.

La disfunción de la PAH produce hiperfenilalaninemia (HPA). En un 1-2% de los casos, la HPA puede deberse a un déficit del cofactor, L-tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (Figura 3).

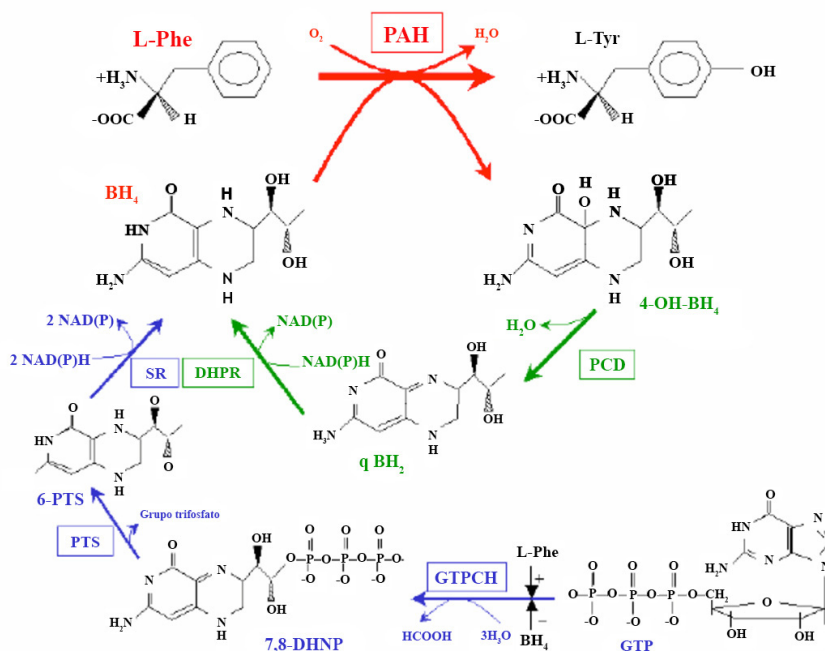


Figura 3. Hidroxilación de la Phe. El ciclo catalítico de la PAH en presencia de su cofactor natural BH<sub>4</sub> se expresa en rojo, las rutas principales de biosíntesis de BH<sub>4</sub> en azul, y las de reducción del cofactor oxidado en verde. Las enzimas implicadas se muestran en recuadros. Se indica activación (+) ejercida por la L-Phe y la inhibición (-) ejercida por la BH<sub>4</sub> sobre la etapa limitante en la biosíntesis del cofactor.

La BH<sub>4</sub> está implicada en varias reacciones enzimáticas (Figura 4). Las enzimas conocidas que dependen de BH<sub>4</sub> son PAH, tirosina hidroxilasa (TYH), triptófano hidroxilasa (TRYH) 1 y 2, los 3 tipos de óxido nítrico sintetasa (NOS) y gliceril-éter monooxigenasa (GEMO).

A nivel celular se ha identificado BH<sub>4</sub> como factor de crecimiento en *Crithidia fasciculata* y con función de factor de control de infectividad en *Leishmania major*. En el sistema nervioso central BH<sub>4</sub> es un factor de autoprotección para óxido nítrico (NO) o neuroprotector general para NOS y tiene función liberadora de dopamina<sup>1</sup>.

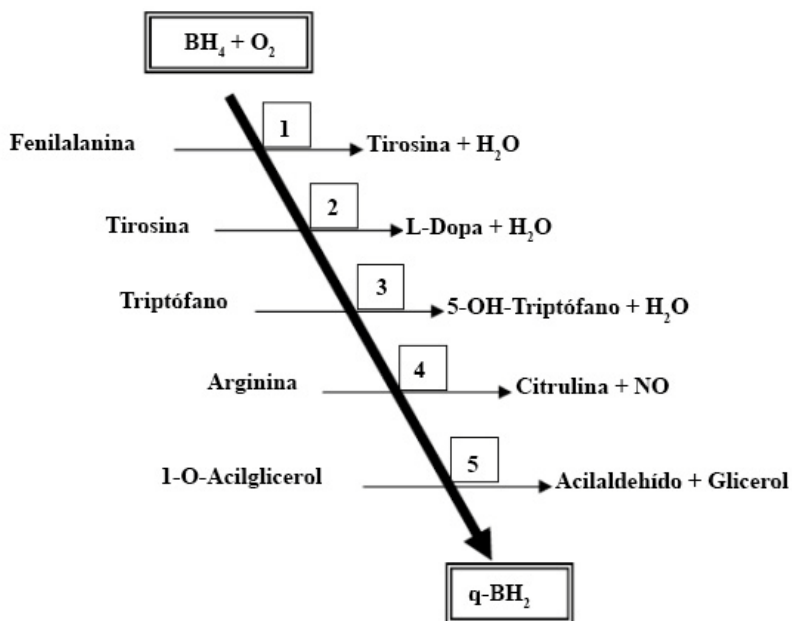


Figura 4. Reacciones enzimáticas mediadas por  $\text{BH}_4$ : 1) Fenilalanina hidroxilasa-PAH; 2) Tisosina hidroxilasa-TYH; 3) Triptófano hidroxilasa-TRYH; 4) Óxido nítrico sintetasa-NOS; 5) Gliceril-eter-monooxigenasa-GEMO. q-BH<sub>2</sub>: quinonoil dihidrobiopterina.

## 2.2. HISTORIA DE LA FENILCETONURIA. LOS INICIOS

En 1934, un médico noruego, Asbjørn Fölling, profesor de Investigaciones nutricionales de la Escuela de Medicina de la Universidad de Oslo, realizó la primera descripción de la fenilcetonuria al estudiar a dos hermanos con retraso mental severo. Ambos niños presentaban además alteraciones cutáneas y un olor corporal especial. Al analizar la orina de los niños, detectó en ésta la presencia de ácido fenilpirúvico, y decidió entonces explorar si esta relación estaba presente en otros niños con retraso mental<sup>2</sup>.

Fölling identificó así 34 pacientes más procedentes de 22 familias diferentes; además observó que todos ellos compartían una serie de características comunes tales como tez clara, dermatitis, hombros anchos, figura encorvada, marcha espástica y deterioro intelectual severo. Denominó esta enfermedad como "*Imbecillitas phenylpirúvica*" y los datos genealógicos de esta muestra le dieron la convicción evidente de que su herencia era autosómica

recesiva<sup>3</sup>. El término fenilcetonuria no se acuñó hasta 1937<sup>4</sup> y su expresión abreviada, PKU, se ha venido utilizando en los últimos 20 años.

En su primer artículo sobre PKU, Fölling teorizó que el aumento de la cantidad de ácido fenilpirúvico observado en las muestras de orina de los niños era resultado de una incapacidad para metabolizar la fenilalanina, un aminoácido. Sucesivas mediciones de los niveles de fenilalanina en sangre de pacientes afectados de PKU confirmaron esta teoría<sup>3,4</sup>.

A partir de esta aportación, otros científicos como George Jervis en EEUU y Lionel Penrose en Inglaterra, iniciaron investigaciones sobre PKU en las poblaciones de sus países<sup>5</sup>.

Jervis observó que si daba Phe a individuos sanos aumentaba la Tyr, sin embargo, esto no ocurría en los pacientes con fenilcetonuria, en los que sí aumentaba la excreción de ácido fenilpirúvico en orina; además los fluidos corporales de los pacientes con PKU contenían una cantidad anormalmente elevada de fenilalanina. Por todo ello, llegó a la conclusión de que estos pacientes tenían problemas en catalizar la conversión de fenilalanina a tirosina y en 1953, demostró que la enzima fenilalanina hidroxilasa, que convierte la fenilalanina en tirosina en el hígado normal, estaba ausente en el hígado de los pacientes afectados de PKU<sup>6,7</sup>.

En 1951 Woolf y Vulliamy fueron los primeros en sugerir que los niveles de fenilalanina y sus productos de degradación podían reducirse mediante la restricción dietética de la ingesta de fenilalanina. También postulaban que otra posibilidad para reducirlos podría ser aumentar la tasa de excreción de fenilalanina administrando alguna sustancia que compitiera para reducir la reabsorción tubular<sup>8,9</sup>. Dos años más tarde, Bickel *et al*, siguiendo con esta idea, elaboraron una dieta restringida en fenilalanina y la usaron para tratar a un niño con PKU que tenía retraso mental. Demostraron que la dieta conseguía una reducción importante en la concentración de fenilalanina sanguínea y mejoraba el comportamiento. Durante los siguientes años, varios niños con riesgo de presentar PKU fueron diagnosticados e iniciaron la dieta pronto tras el



nacimiento. Estudios posteriores demostraron que bajo estas condiciones la dieta podía prevenir el retraso mental<sup>10-12</sup>.

De esta forma, a mediados de los años 50, se desarrolló una dieta especial que consiguió prevenir el desarrollo de retraso mental en pacientes con PKU. Para ello se debía iniciar la dieta a edades precoces de la infancia, antes de que se hubiera establecido el retraso mental, y por tanto, preferentemente en el período neonatal. Esta evidencia condujo al cribado neonatal de PKU<sup>13</sup>.

En 1961 Guthrie desarrolló un método que permitía la determinación de Phe. Este método inicialmente se basaba en una técnica llamada “inhibición competitiva”: un compuesto que normalmente evita el crecimiento de una bacteria *in vitro*, deja de hacerlo cuando grandes cantidades de Phe están presentes en la sangre analizada. Como resultado, en cualquier zona donde haya un nivel elevado de fenilalanina en la muestra de sangre, habrá un crecimiento bacteriano fácilmente detectable<sup>14</sup>.

Sin embargo, ésta era una técnica laboriosa, inviable como cribado neonatal masivo. Entonces se dio cuenta de que una forma simple de recoger sangre entera de los niños era pinchar el talón y secar las gotas de sangre emergente con papel de filtro. Así surgió el test de Guthrie, y se inició el cribado neonatal de la PKU<sup>14,15</sup>.

En 1968 Wilson y Jungner formularon los principios de detección precoz de enfermedades<sup>16</sup>, que han sido desde entonces el marco principal para considerar si un programa de cribado es aplicable o no. Dichos principios son los que a continuación se enumeran:

- La enfermedad debe constituir un problema importante de salud.
- Debe existir un tratamiento aceptado para los pacientes en los que se identifica la enfermedad.
- Es preciso disponer de servicios de diagnóstico y tratamiento.
- Debe existir una fase de latencia o de síntomas incipientes.

- Debe disponerse de una prueba o examen apropiado.
- La prueba debe ser aceptable para la población.
- Es necesario conocer debidamente el ciclo natural de la enfermedad, inclusive la evolución desde la fase de latencia hasta la de enfermedad declarada.
- Se debe establecer una norma sobre las personas que deben tratarse como enfermos.
- El coste del programa de localización de casos (incluido el diagnóstico y tratamiento de los pacientes diagnosticados), debe estar económicamente equilibrado en relación con los posibles gastos totales de atención médica.
- La localización de casos debe constituir un proceso ininterrumpido, no un proyecto de “una sola vez”.

Siguiendo estos criterios, la PKU, junto con otras enfermedades hereditarias metabólicas, forma parte del cribado metabólico neonatal en la práctica totalidad del mundo occidental.

Udenfried y Cooper en 1952<sup>17</sup> y Kaufman en 1957<sup>18</sup> describieron el proceso químico del metabolismo de la Phe en el hígado, que implica varios componentes como el oxígeno, la PAH, la dihidropterina reductasa (DHPR), la BH<sub>4</sub> y la nicotinamida adenina dinucleótido reductasa (NADH) (ver Figuras 2 y 3). En pacientes con PKU clásica la alteración se produce a nivel de la PAH, mientras que en otros pacientes la alteración se debe a la deficiencia de la coenzima BH<sub>4</sub><sup>19</sup>.

Los doctores Chen y Woo, ambos del Departamento de Medicina Celular y Genética en la Escuela de Medicina Mount Sinai, aislaron e identificaron por primera vez en 1983 el gen *PAH*, que codifica la enzima fenilalanina hidroxilasa, y que se localiza en el cromosoma 12 (12q22-24)<sup>20</sup>.

En los últimos años, la investigación genética ha llevado a realizar varios ensayos de expresión in vitro de numerosos alelos de *PAH*, visualizándose varios dominios de la *PAH*, lo que ha dado origen a los primeros ensayos sobre terapia génica.

## **2.3. CONCEPTOS BÁSICOS**

### **2.3.1. Aminoácidos. Definición**

Los aminoácidos son sustancias químicas orgánicas en cuya composición molecular un grupo amino básico y un grupo carboxilo ácido se unen a la misma molécula de carbono. Se diferencian por el radical de la molécula R. Proceden de las proteínas de la dieta, de la proteólisis muscular y de la síntesis propia. Son utilizados por el organismo para la biosíntesis de proteínas, como precursores de sustratos nitrogenados (neurotransmisores, catecolaminas, etc.) y en pequeña cantidad son eliminados por heces, orina y descamación cutánea<sup>21</sup>.

En una clasificación, específicamente nutricional, los aminoácidos pueden ser esenciales o no esenciales. Los primeros se llaman así debido a que su síntesis corporal es inadecuada o nula para satisfacer las necesidades metabólicas y por tanto deben ser aportados como parte de la dieta. Los aminoácidos no esenciales, si no están presentes en cantidades adecuadas en el momento de la síntesis proteica, pueden ser sintetizados mediante diferentes procesos, como la transaminación, ya sea a partir de aminoácidos esenciales o a partir de precursores apropiados de carbono y nitrógeno que se encuentran en la célula.

Los aminoácidos esenciales son: la valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp), lisina (Lys), metionina (Met) y treonina (Thr). La arginina (Arg) y la histidina (His) son esenciales en los niños muy pequeños ya que sus requerimientos son mayores que su capacidad para sintetizar estos aminoácidos.

Los aminoácidos no esenciales son: la glicina (Gly), alanina (Ala), prolina (Pro), hidroxiprolina (Hyp), hidroxilisina (Hyl), serina (Ser), arginina (Arg),

taurina (Tau), histidina (His), ácido glutámico (Glu), cisteína (Cys), tirosina (Tyr), asparagina (Asn), glutamina (Gln) y ácido aspártico (Asp)<sup>22</sup>.

### **2.3.2. Fenilalanina**

La fenilalanina es un aminoácido aromático esencial que constituye aproximadamente el 5% de las proteínas, y cuyos niveles en sangre y líquido cefalorraquídeo (LCR) permanecen prácticamente constantes a lo largo de toda la vida desde el momento del nacimiento.

Los niveles de fenilalanina en sangre aumentan a expensas de la fenilalanina procedente de la dieta y del catabolismo proteico, y disminuyen a expensas de su utilización en la síntesis proteica, la hidroxilación de fenilalanina a tirosina, la eliminación urinaria, y en circunstancias excepcionales, de su descarboxilación y transaminación a feniletilamina y fenilpiruvato, respectivamente<sup>21</sup>.

La fenilalanina es un precursor de la tirosina, y ambos aminoácidos actúan a su vez como precursores de las catecolaminas DOPA (dopamina, adrenalina y noradrenalina), de la melanina y de la tiroxina<sup>22</sup>.

## **2.4. HIPERFENILALANINEMIA**

### **2.4.1. Concepto**

La hiperfenilalaninemia es el error congénito del metabolismo de los aminoácidos más frecuente, constituyendo un grupo genéticamente heterogéneo de alteraciones congénitas del metabolismo de la fenilalanina, que tienen en común un déficit de su hidroxilación y como consecuencia de ello un aumento de sus niveles en sangre.

Fue la primera enfermedad en la que se identificó un agente tóxico, la fenilalanina, como causa de retraso mental severo y para la cual se encontró un tratamiento que prevenía la aparición de las características clínicas de la enfermedad.

### 2.4.2. Epidemiología

En Europa la incidencia oscila alrededor de 1 por cada 10.000 nacimientos, pero en algunas zonas de Europa esta incidencia es más elevada. En Turquía se ha detectado en 1 de cada 4.000 nacimientos, debido a la elevada consanguinidad en su población, y también se han observado incidencias más elevadas en el norte de Irlanda, mientras que Finlandia tiene la prevalencia más baja de Europa con 1 caso cada 100.000.

En EEUU se ha observado una prevalencia de 1/15.000.

En Latinoamérica varía entre un caso por 25.000-50.000 nacimientos, con prevalencia más elevada en el sur de Latinoamérica.

Las prevalencias en Asia varían de 1 por cada 15.000-100.500 nacimientos según las diferentes regiones de China, <1/200.000 en Tailandia y cerca de 1/70.000 en Japón.

África parece tener una prevalencia de fenilcetonuria muy baja y España tiene una prevalencia especialmente elevada de hiperfenilalaninemia leve.

En España la incidencia estimada es de 1:19.747 para PKU y de 1:12.422 la de las hiperfenilalaninemias moderadas y leves<sup>23</sup>. En Galicia, Couce *et al* describen una prevalencia de PKU de 1/12.363 mientras que la de HPA benignas es de 1/6.005<sup>24</sup>.

### 2.4.3. Fisiopatología

La mayor parte de los casos de hiperfenilalaninemia se deben a alguna mutación en el gen que codifica la enzima hepática PAH, que convierte la fenilalanina en tirosina utilizando como cofactor la BH<sub>4</sub>, común para las hidrolasas de la tirosina y del triptófano. En un 1-2% de los casos, se debe a una alteración en los genes que codifican las enzimas implicadas en la biosíntesis o regeneración del cofactor BH<sub>4</sub><sup>25</sup>.

Esta vía es responsable del catabolismo y de la eliminación de aproximadamente el 75% de la Phe ingerida en la dieta, mientras que el resto se utiliza para la síntesis de proteínas<sup>25</sup>.

Durante la hidroxilación de la Phe por la PAH y en presencia de oxígeno molecular y hierro, la BH<sub>4</sub> es oxidada a 4α-hidroxi-BH<sub>4</sub>, que posteriormente es regenerada de nuevo a BH<sub>4</sub>, vía la quinonoid (q) dihidrobiopterina por las enzimas pterina-4αcarbinolamina deshidratasa (PCD) y dihidropteridina reductasa dependiente de NADH. La BH<sub>4</sub> se sintetiza a partir de la guanosina trifosfato (GTP) mediante la intervención seriada de 3 enzimas adicionales: GTP ciclohidrolasa I (GTPCH), 6-piruvilo tetrahidropterina sintasa (PTPS) y siapterina reductasa (SR)<sup>23</sup> (Figura 5).

Además, para que la BH<sub>4</sub> funcione correctamente, precisa de la intervención de los enzimas DHPR y PCD y del cofactor NADH<sup>23</sup>.

Mutaciones en los genes que codifican estos enzimas (PCD, DHPR, GTPCH, PTPS y SR) conllevan un déficit de BH<sub>4</sub>.

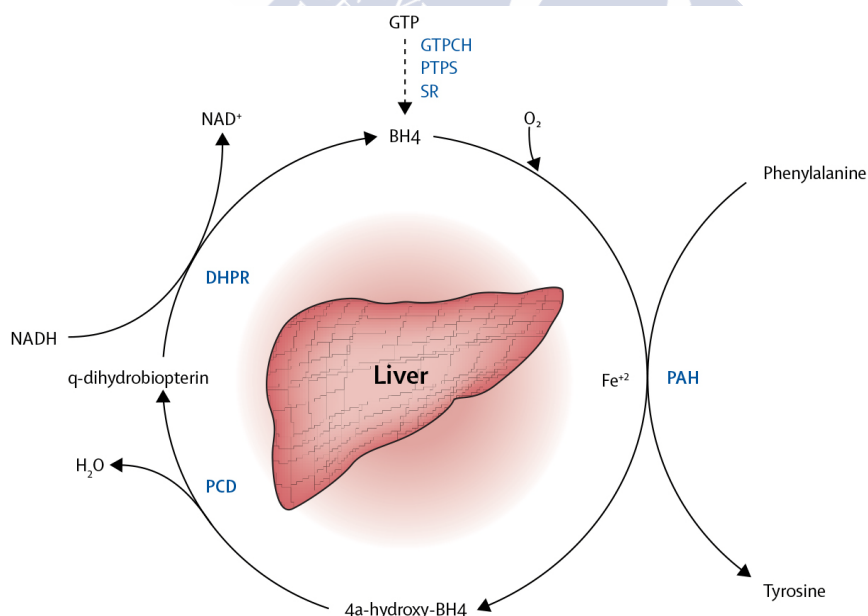


Figura 5. Hidroxilación de la fenilalanina (Fuente: Blau *et al*).

El déficit de la actividad de la PAH supone un aumento y acúmulo de los niveles de fenilalanina y sus metabolitos (fenilacético, feniláctico y fenilpirúvico) en la sangre y en los tejidos de los pacientes afectos y, ocasionalmente, una disminución de los valores de tirosina (que se convierte en un aminoácido esencial) y sus derivados. En algunos casos los niveles de tirosina pueden mantenerse normales o en límites bajos<sup>23</sup>.

Las concentraciones elevadas de Phe en el cerebro pueden perjudicar la función neuropsicológica a través de varios mecanismos, no bien conocidos todos ellos en la actualidad. En estudios de imagen se han descrito lesiones de la sustancia blanca asociadas con una reducción en la formación de mielina, aunque todavía no se ha establecido una unión causal definitiva entre esta desmielinización y el daño neuropsicológico. Además, es posible que una alteración en la función de los neurotransmisores pudiera desempeñar un papel, ya que los aportes reducidos de tirosina secundarios a las bajas o nulas tasas de hidroxilación de Phe, reducirían la síntesis de dopamina (y consecuentemente de noradrenalina)<sup>26</sup>.

La entrada de fenilalanina en el cerebro es mediada por el L-aminoácido transportador 1 (LAT 1) de la barrera hematoencefálica. La fenilalanina comparte este L-transportador con otros aminoácidos neutros, como la tirosina y el triptófano (precursor de la serotonina), lo que podría reducir aún más la disponibilidad de dopamina y de serotonina<sup>26</sup> (Figura 6).

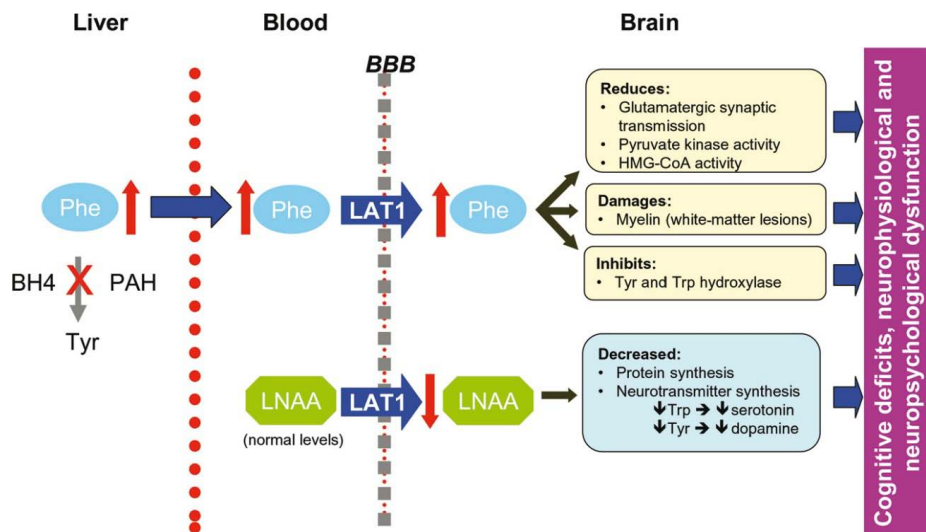


Figura 6. Resumen de los potenciales mecanismos de deterioro neurológico causados por la HPA. BBB: barrera hematoencefálica. LAT 1: L-aminoácido transportador 1. LNAA: aminoácidos neutros de gran tamaño. (Fuente: Feillet *et al*).

Evidencias experimentales indican que la hiperfenilalaninemia ocasiona un efecto patógeno directo por competición con la glicina en los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), puede interferir en los sistemas glutamatérgicos, esenciales en el normal desarrollo cerebral, la vía de la síntesis de colesterol (por medio de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A) y la glicolisis (posiblemente por medio de la inhibición de la piruvato quinasa)<sup>21,26</sup>.

En la HPA por déficit del cofactor BH<sub>4</sub> existirá además un déficit de los neurotransmisores L-dopa, dopamina, 5-hidroxitriptófano y serotonina. En los casos de déficit de DHPR, se suman las consecuencias de la anomalía coexistente en el metabolismo del folato<sup>21</sup>.

## 2.5. DEFICIENCIA DE PAH. GENÉTICA

El gen *PAH* está presente en el cromosoma 12 (12q22-24) y consta de 13 exones y sus requeridos intrones. La PKU tiene lugar cuando ambos alelos están mutados. Las dos mutaciones pueden ocurrir en cualquiera de los exones, en las zonas de unión de los intrones que intervienen, o quizás en otras áreas del gen todavía sin identificar, así como en la región promotora. La PKU es una



enfermedad con herencia autosómica recesiva. Aquellos que sólo tienen un alelo mutado del gen *PAH* son portadores y no presentan características químicas ni clínicas de PKU<sup>23</sup> (Figura 7).

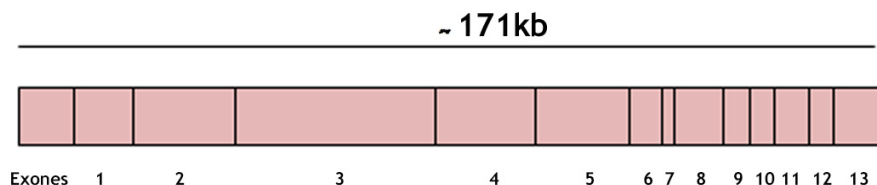


Figura 7. Organización estructural del gen *PAH* (Fuente: Pey *et al*)

Existen en la actualidad más de 780 mutaciones descritas, estando el 60% de las mutaciones europeas en 5 alelos. La gran heterogeneidad genética de la PKU, debida a numerosas mutaciones alélicas y diferencias interpoblacionales, hace que la base genética de la enfermedad sea compleja. Por ello, se creó la base de datos pública “Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase”<sup>27</sup>, que permite un registro de todas las variantes alélicas encontradas en los pacientes diagnosticados de PKU en todo el mundo. Esta base de datos es mantenida y actualizada en el McGill Hospital ([www.pahdb.mcgill.ca](http://www.pahdb.mcgill.ca)). Concretamente, esta base de datos ha conseguido catalogar hasta el momento un total de 567 mutaciones de la PAH; de las cuales un 60,5% son mutaciones de cambio de aminoácido (missense), 13,5% delecciones, 11% mutaciones que afectan al procesamiento del mRNA (splice site mutations), 5,7% mutaciones silentes, 5% mutaciones sin sentido (nonsense) y 1,8% inserciones<sup>28</sup>. De tal forma que la mayoría de los pacientes PKU son heterocigotos compuestos, es decir, que portan diferentes mutaciones en cada uno de sus alelos.

Existe otra base de datos creada por la universidad de Zurich, llamada BIOPKU ([www.biopku.org](http://www.biopku.org)), que hasta el momento (datos de julio de 2015) ha conseguido valorar el genotipo completo de 8.124 pacientes PKU, junto con su fenotipo (basado en los niveles de Phe más altos previo al inicio del tratamiento) y su respuesta a la BH<sub>4</sub>. De esta base de datos se han encontrado 890 combinaciones de mutaciones diferentes, siendo el 75% heterocigotos.

El diagnóstico molecular de la PKU se hizo posible gracias a la clonación y caracterización del gen de la PAH<sup>29,30</sup>. La enzima PAH tiene 3 dominios: un dominio regulador N-terminal (residuos 1-142), un dominio catalítico (residuos 143-410) y un dominio tetramerizador C-terminal (residuos 411-452). Debido a la dificultad de cristalizar su extensión completa, no se ha determinado la estructura tetramérica completa de PAH. Sin embargo, sí se han podido componer formas incompletas: una forma dimérica que contiene los dominios regulador y catalítico<sup>31</sup> y una forma tetramérica que contiene los dominios catalítico y tetramerizador<sup>32</sup>. Basándose en estas estructuras, se construyó un modelo por sobreposición de dominios catalíticos<sup>33</sup>. De ahí han surgido innumerables avances en el conocimiento de la genética de la PKU. Es decir, la cristalización de estructuras de diferentes formas incompletas de la PAH, ha permitido la construcción de un modelo para una PAH tetramérica (Figuras 8 y 9) de extensión ampliada y ha proporcionado una base estructural para el estudio de las numerosas mutaciones que resultan en una actividad de PAH deficiente.

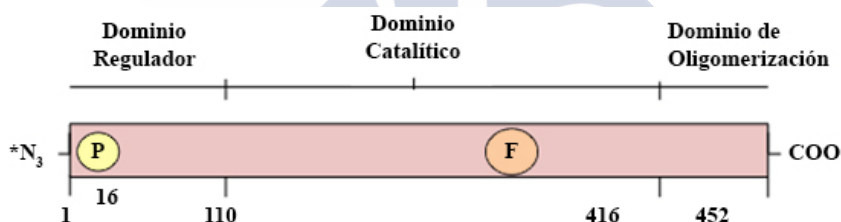


Figura 8. Estructura primaria de la proteína PAH, donde se localizan los dominios funcionales, el átomo de hierro y el sitio de fosforilación<sup>33</sup>.

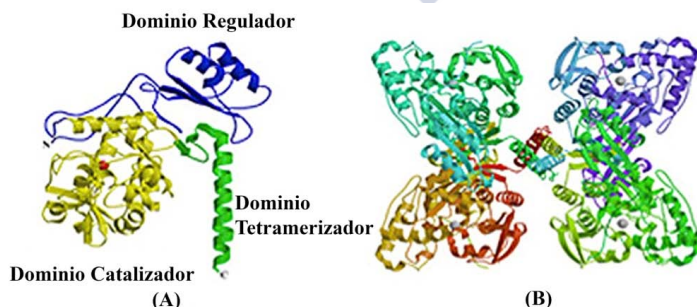


Figura 9 A) Modelo tridimensional propuesto para la PAH en forma monomérica<sup>34</sup> B) Modelo tridimensional propuesto para la forma tetramérica de la PAH<sup>28</sup>.

La mayoría de los pacientes PKU (75%) son compuestos heterocigotos de 2 mutaciones diferentes y, con excepción de la población del Norte de Europa o la población del Este del continente, donde se han descrito 2 mutaciones mayoritarias (p.R408W e IVS12nt1G>A), en el resto de las poblaciones estudiadas las mutaciones encontradas suponen cada una de ellas menos de un 10% de todos los alelos mutantes. En Galicia, las mutaciones más prevalentes son IVS10nt-11G>A y p.R261Q, con frecuencias de 13,8% y 10,5%, respectivamente<sup>35</sup>.

## 2.6. CLÍNICA

En la PKU clásica, en ausencia de tratamiento, los niveles elevados de Phe en sangre se asocian con discapacidad neuropsicológica, especialmente en los primeros años de vida, presentando como característica clínica principal retraso mental de mayor o menor severidad, retraso psicomotor, autismo, convulsiones y déficits motores con problemas del desarrollo, comportamiento anómalo y síntomas psiquiátricos que aparecen evolutivamente<sup>23</sup>, ya que el daño producido por la HPA no se manifiesta de forma aguda, sino que es necesario un acúmulo prolongado para que se observen alteraciones neurológicas. De esta forma en el período neonatal y durante los primeros meses de vida se encuentran asintomáticos hasta el final de la lactancia, cuando debutan estas alteraciones en intensidad o gravedad variables según el tipo de fenilcetonuria que presenten.

Los pacientes PKU sin tratamiento pueden desarrollar trastornos del comportamiento severos, hiperactividad, agresividad y autolesiones. En pacientes adultos con PKU se han observado temblores e hiperreflexia<sup>26</sup>.

Suelen tener piel, ojos y pelo más claros que el resto de sus familiares sanos (por estar disminuida la síntesis de melanina), tendencia a la dermatitis, microcefalia, crecimiento retardado, hombros anchos, figura encorvada y un olor corporal y de la orina característico que recuerda al de los ratones o a la paja mojada (debido a la excreción del ácido fenilacético)<sup>3</sup>.

El objetivo del tratamiento de la hiperfenilalaninemia en pacientes PKU es prevenir el establecimiento o el empeoramiento de tales complicaciones de la enfermedad. Los enfermos que siguen un tratamiento adecuado e instaurado de forma precoz tienen un desarrollo neurológico e intelectual dentro de los límites normales.

## 2.7. DIAGNÓSTICO

### 2.7.1. Cribado

El cribado de PKU debe ser realizado a todos los recién nacidos en los primeros días de vida para permitir una intervención terapéutica lo más precoz posible y así prevenir el desarrollo de secuelas neurológicas. La muestra de sangre se suele obtener al tercer día de vida<sup>28</sup>, tras punción del talón (Figura 10). Recientemente se ha publicado la posibilidad de realizar dicha extracción tras punción venosa a nivel del dorso de la mano, ya que ello parece ofrecer como ventaja menos dolor para el niño, así como menos riesgo de efectos secundarios tales como osteocondritis del calcáneo, equimosis, hematomas, etc<sup>36</sup>.



Figura 10. Toma de muestra de sangre en el talón de un recién nacido para realizar las pruebas de cribado metabólico.

La sangre se recoge en un papel de filtro absorbente denominado genéricamente tarjeta de Guthrie, que cumpla con las normas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (2014/07 de Munktel).

La clásica prueba de Guthrie ya no se utiliza. En la actualidad se han ido desarrollando otros métodos analíticos que mejoran la precisión, sensibilidad, viabilidad y tiempo de ejecución del test analítico. El cribado de la PKU se puede realizar mediante fluorimetría, métodos enzimáticos colorimétricos, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en papel o en capa fina y últimamente mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

La espectrometría de masas en tándem es un método rápido para conseguir determinaciones fiables y cuantitativas de las concentraciones de aminoácidos en pequeños volúmenes de sangre o plasma. Este método proporciona menos tasa de resultados falsos positivos, mediante la medición de los niveles de fenilalanina y tirosina y provee la proporción fenilalanina/tirosina. Además, pueden ser evaluados a la vez otros errores congénitos del metabolismo<sup>28,37</sup>.

El punto de corte para la Phe se establece en 150  $\mu\text{mol/L}$  si se determina por métodos fluorométricos y en 120  $\mu\text{mol/L}$  si es por MS/MS, y se considera normal una relación Phe/Tyr <2. Para una determinación correcta es necesario asegurarse de que el paciente haya realizado una ingesta adecuada de proteínas y que no esté recibiendo nutrición parenteral<sup>38</sup>.

Algunos niños, particularmente los recién nacidos prematuros, pueden presentar inmadurez de los sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo de los aminoácidos, resultando así una elevación transitoria en sangre de Phe que da positivo en el test de cribado de PKU. Los resultados de un cribado precoz de PKU en neonatos enfermos o sometidos a alimentación parenteral o transfusión sanguínea, deberían ser interpretados con precaución, realizándose un segundo test si no está claro que el niño haya ingerido suficiente proteína cuando el primer test fue realizado<sup>23,28</sup>. Situaciones especiales en las que debe realizarse una segunda muestra son:

- Prematuros y gemelos monocigóticos:

Se recomienda una segunda toma de muestra en los prematuros de menos de 34 semanas y/o 2.000 g de peso y gemelos monocigóticos al mes de vida, o entre la tercera y cuarta semana de vida.

- Recién nacidos con patología grave al nacimiento:

En estos casos, se debe tomar una muestra en el momento de ingreso (antes de que puedan recibir tratamiento antibiótico, alimentación parenteral,...) y repetirla a las 48-72 horas de vida según los resultados, fundamentalmente porque pueden existir elevaciones transitorias de TSH/IRT en la primera muestra.

- Transfusiones previas al cribado:

En este caso se debe realizar una toma de muestra a las 48-72 horas de la transfusión y repetirla a los 120 días.

- Alimentación parenteral:

En aquellos pacientes que estén recibiendo esta nutrición debe practicarse un nuevo cribado a los tres días de haber reiniciado la alimentación enteral normal, con independencia de la edad del niño en ese momento.

### **2.7.2. Confirmación Diagnóstica**

En todos los casos de hiperfenilalaninemia, tras asegurarse de que el paciente recibe una alimentación con una ingesta proteica equivalente a 3 gramos de proteínas naturales/kg/día (150 mg/kg/día de Phe)<sup>39</sup>, se procede a la confirmación y diagnóstico diferencial de la hiperfenilalaninemia mediante:

- Cuantificación de aminoácidos en plasma o suero (permite establecer los niveles de Phe y Tyr).
- Valoración de la actividad de DHPR en eritrocitos<sup>40</sup> en sangre total en papel de filtro.
- Cuantificación e identificación de aminoácidos, ácidos orgánicos y pterinas (neopterina y biopterina)<sup>41</sup> en orina de al menos 6-12 horas recogida en oscuridad y congelada posteriormente.

### 2.7.3. Defectos del cofactor BH<sub>4</sub>

Aproximadamente un 1-2% de las elevaciones de Phe detectadas en el cribado neonatal son debidas a alteraciones en el metabolismo de la BH<sub>4</sub><sup>42</sup>. Las alteraciones de la BH<sub>4</sub> son más severas que la PKU por deficiencia enzimática, en el sentido de que su respuesta al tratamiento es sustancialmente diferente, ya que no responden a la dieta restringida en proteínas naturales. El análisis de orina, como veremos más adelante, para el estudio de neopterina y biopterina y la medición de la actividad de DHPR en sangre, son imprescindibles para el diagnóstico de esta entidad, y ha de llevarse a cabo lo antes posible.

En los defectos del cofactor BH<sub>4</sub>, los niveles de fenilalanina son muy variables, desde 150 µmol/L hasta incluso 3.600 µmol/L. La actividad DHPR en eritrocitos se encuentra disminuida en las deficiencias de DHPR. En las deficiencias de GTPCH y en las de PTPS, la actividad DHPR es normal<sup>43</sup>.

Con la valoración de excreción de pterinas en orina se puede precisar ante qué déficit concreto nos encontramos<sup>44</sup>:

- Neopterina normal, biopterina muy aumentada, con un porcentaje de biopterinas >84%: Deficiencia de DHPR.
- Neopterina y biopterina muy disminuidas, porcentaje de biopterina del 50%: Deficiencia de GTPCH.
- Neopterina muy aumentada, biopterina muy disminuida, porcentaje de biopterina <12%: Deficiencia en PTPS.
- Presencia de primapterina (“7-biopterina”) en orina: Deficiencia de PCD.

Ante la sospecha de una deficiencia en la síntesis y/o en el reciclaje de la BH<sub>4</sub>, deberemos efectuar dos pruebas más<sup>45</sup>:

- Determinación de pterinas y neurotransmisores en LCR, ya que los niveles de ácido homovanílico (HMV) y ácido 5 hidroxindolacético (5HIA) en LCR están muy disminuidos<sup>45</sup>, así como las diferencias en

los ratios de los niveles de neurotransmisores, que proporcionan información diagnóstica relevante en cuanto a la severidad del déficit de BH<sub>4</sub><sup>46</sup>.

- Sobrecarga con BH<sub>4</sub> oral: esta prueba consiste en la administración al paciente de 20 mg/kg de BH<sub>4</sub>, tomando muestras de sangre basal (antes de la sobrecarga), y a las 4, 8, 12 y 24 horas de la misma<sup>28,44</sup>.

En las deficiencias de síntesis de BH<sub>4</sub> (deficiencias de GTPCH y de PTPS) se normalizan los valores de Phe a las 4 horas post-BH<sub>4</sub> y se mantienen normales en las siguientes tomas de la sobrecarga. En las deficiencias de DHPK, disminuye la Phe basal un 30-40% entre las 4 y 8 horas pero posteriormente vuelve a aumentar hasta los niveles basales.

#### **2.7.4. Sobrecarga de BH<sub>4</sub>**

Antes se utilizaba esta prueba únicamente en las deficiencias de síntesis o de regeneración del cofactor, pero tras los estudios de Kure<sup>39</sup>, en los que se constató que algunos pacientes PKU responden a la sobrecarga de BH<sub>4</sub>, ahora se practica en todos los pacientes con hiperfenilalaninemia que precisen tratamiento (Figura 11).

El test de sobrecarga de BH<sub>4</sub> permite así identificar a los pacientes PKU que responden a la administración de BH<sub>4</sub>. Esto es importante ya que en estos pacientes la administración de BH<sub>4</sub> disminuye los niveles sanguíneos de Phe, o incluso puede llegar a normalizarlos<sup>47</sup>.

La mayoría de protocolos de test de sobrecarga de BH<sub>4</sub> que se utilizan para diagnosticar la respuesta a la BH<sub>4</sub>, se han descrito con dosis iniciales de 10-20 mg/kg de sapropterina. Una concentración plasmática de 400 μmol/L al comienzo del test se considera un punto de corte razonable para poder observarse un efecto clínico sustancial de la medicación, si bien es cierto que límites más bajos pueden ser también valorables para los pacientes más jóvenes. Una reducción de la Phe sanguínea del 30% se considera una respuesta positiva al tratamiento, otros la consideran a partir del 50%, aunque se reconoce en ficha



técnica la libertad del médico prescriptor para individualizar el punto de corte a partir del cual considera la respuesta positiva en función de cada caso individual. Si los niveles sanguíneos de Phe se encuentran entre 360 y 400  $\mu\text{mol/L}$ , se miden de nuevo los niveles de Phe y se comprueba la tolerancia a la Phe antes del test de sobrecarga con  $\text{BH}_4$ .

La respuesta a la  $\text{BH}_4$  es más habitual en las formas más moderadas, que son debidas a mutaciones de la PAH en las que esta enzima tiene todavía una actividad residual<sup>48</sup>.

La tasa de respuesta a la  $\text{BH}_4$  varía, y los respondedores lentos (pacientes que no responden con una reducción sustancial en los niveles sanguíneos de Phe dentro de las 24 horas de iniciada la sobrecarga), suponen un 20-30% del total de respondedores<sup>49,50</sup>.

El protocolo propuesto por el grupo de trabajo europeo<sup>51</sup> propone administrar una dosis de sapropterina a 20 mg/kg y medir los niveles sanguíneos de Phe a las 8, 16 y 24 horas. Si se observa descenso de la Phe sanguínea  $\geq 30\%$ , se considera positivo. Con ello se consigue identificar a los respondedores iniciales a  $\text{BH}_4$ . Se puede en las siguientes 24 horas, realizar un segundo test a los pacientes no respondedores (descenso de los niveles sanguíneos de Phe  $< 30\%$ ), administrándoseles otra dosis de sapropterina a 20 mg/kg y si se observa descenso de la Phe sanguínea  $\geq 30\%$  se considera positivo. Con este segundo test se consigue por lo tanto identificar a los respondedores lentos.

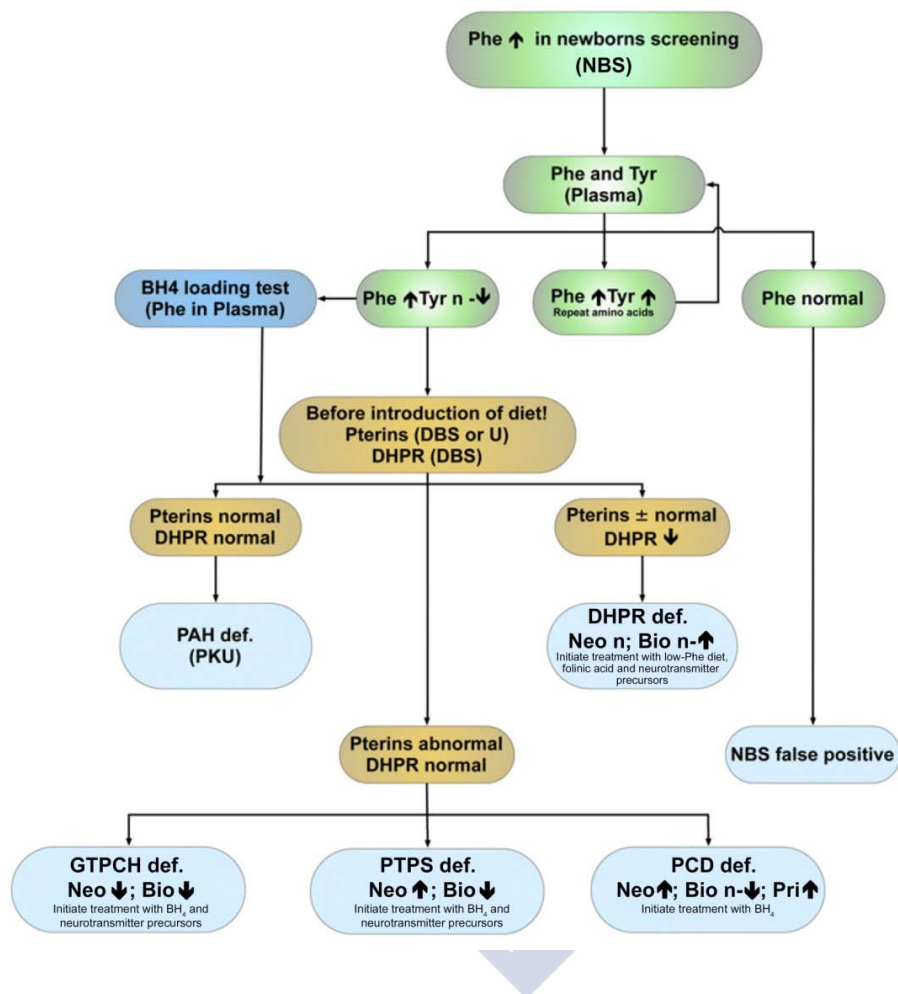


Figura 11. Diagrama diagnóstico de la PKU y de los defectos de BH<sub>4</sub>. (Fuente: Blau *et al*).

## 2.8. CLASIFICACIÓN

La HPA puede ser clasificada en 2 categorías generales, según cuál de las 2 enzimas que participan en el sistema de hidroxilación de la Phe esté alterada: PAH o cofactor BH<sub>4</sub>.

Dependiendo del defecto enzimático, el genotipo y la severidad de la HPA (basada en las concentraciones sanguíneas de Phe sin tratamiento) pueden distinguirse cuatro fenotipos diferentes<sup>52</sup>:

- Niveles 120 a 360  $\mu\text{mol/L}$ : HPA benigna.
- Niveles 360-600  $\mu\text{mol/L}$ : PKU leve.
- Niveles 600-1200  $\mu\text{mol/L}$ : PKU moderada.
- Niveles  $\geq 1200$   $\mu\text{mol/L}$ : PKU clásica.

En los tres primeros tipos, existe una cierta actividad residual del enzima, mientras que en la PKU clásica, la actividad de la PAH es nula o muy escasa<sup>23,35</sup>.

Esta clasificación no siempre es sencilla, ya que las concentraciones de Phe son medidas en los recién nacidos en un momento en que la Phe en sangre puede no haber tenido tiempo de alcanzar su máximo nivel, y los puntos de corte para estas clasificaciones varían entre distintos países<sup>26</sup>.

La clasificación también puede realizarse en base a la tolerancia de la Phe de la dieta, lo cual no siempre es fácil de medir con precisión. Así, en la PKU clásica, la tolerancia habitualmente no es mayor de 250 mg/día, mientras que en la PKU leve o incluso moderada, la tolerancia puede ir desde los 250 a los 400 mg/día<sup>23</sup>.

La tolerancia a la Phe normalmente se determina a los 5 años de edad, y según ella la PKU puede clasificarse en<sup>28</sup>:

- PKU clásica: tolerancia  $< 20$  mg/kg/día (250-350 mg/día).
- PKU moderada: tolerancia de 20 a 25 mg/kg/día (350-400 mg/día).
- PKU leve: tolerancia de 25-50 mg/kg/día (400-600 mg/día).
- Hiperfenilalaninemia leve: pacientes sin necesidad de dieta.

Recientemente se ha demostrado que la tolerancia de fenilalanina puede ser predecible ya a la edad de 2 años y que la tolerancia a la edad de 2,3 y 5 años se correlaciona con la de los 10 años de edad. Por el contrario, en adultos puede ser necesario reajustar la tolerancia a la fenilalanina<sup>28</sup>.

## 2.9. TRATAMIENTO

### 2.9.1. Dieta

La restricción de fenilalanina en la dieta continúa siendo el pilar del tratamiento de la fenilcetonuria y habitualmente se inicia inmediatamente tras la confirmación de la hiperfenilalaninemia en el neonato. El objetivo de la dieta es conseguir concentraciones de fenilalanina en sangre dentro de los niveles recomendados. En la actualidad, la recomendación es suministrar a los pacientes un aporte proteico situado en el rango 113-129% de la cantidad diaria recomendada (CDR)<sup>53</sup>.

El diagnóstico e intervención precoz tras el nacimiento, con dieta restringida en fenilalanina de por vida, mantiene su concentración en sangre dentro de los rangos recomendados para la edad y previene el desarrollo de discapacidades mentales severas<sup>23</sup>.

Para evitar un déficit del resto de aminoácidos presentes en la proteínas naturales, deben suplementar su dieta con preparados, fórmulas de aminoácidos libres de fenilalanina, enriquecidas con hidratos de carbono, lípidos, ácidos grasos esenciales, minerales y vitaminas<sup>23,54</sup>, que varían entre unos productos y otros y que constituyen la mayor fuente de aporte proteico de sus dietas. Estos productos son costosos y tienen un sabor más desagradable.

Este balance entre la tolerancia a la fenilalanina y sus requerimientos, varía de unos pacientes a otros en función de distintos factores, como son la actividad residual de la PAH in vivo, el sexo o la edad<sup>54</sup>.

Aunque la restricción de la fenilalanina en la dieta es el pilar del tratamiento de la fenilcetonuria en todo el mundo, existen diferencias significativas en los niveles de fenilalanina sanguínea que se recomiendan tanto en niños como en adultos entre distintos países<sup>55</sup> (Tabla 1, Figura 12).

	<i>España</i> <sup>44</sup>	<i>Reino Unido</i> <sup>56</sup>	<i>Alemania</i> <sup>57</sup>	<i>EEUU</i> <sup>54</sup>
<i>Inicio tratamiento</i>	≥ 360 μmol/L	> 420μmol/L	> 600 μmol/L	> 600 μmol/L
<i>0 - 6 años</i>	< 360 μmol/L	< 360μmol/L	< 240 μmol/L	< 360 μmol/L
<i>6 - 9 años</i>	< 480 μmol/L	< 480 μmol/L	< 240 μmol/L	< 360 μmol/L
<i>9 - 12 años</i>	< 600 μmol/L	< 480 μmol/L	< 900 μmol/L	< 360 μmol/L
<i>12 - 15 años</i>	< 600 μmol/L	< 700 μmol/L	< 900 μmol/L	< 600 μmol/L
<i>Adolescentes /adultos</i>	< 600 μmol/L	< 700 μmol/L	< 1200 μmol/L	< 900 μmol/L
<i>Embarazo</i>	< 180 μmol/L	< 240 μmol/L	< 240 μmol/L	< 240 μmol/L

Tabla 1. Límites superiores de las concentraciones objetivo de Phe (μmol/L) recomendada para el tratamiento de PKU en diferentes países<sup>23</sup>.

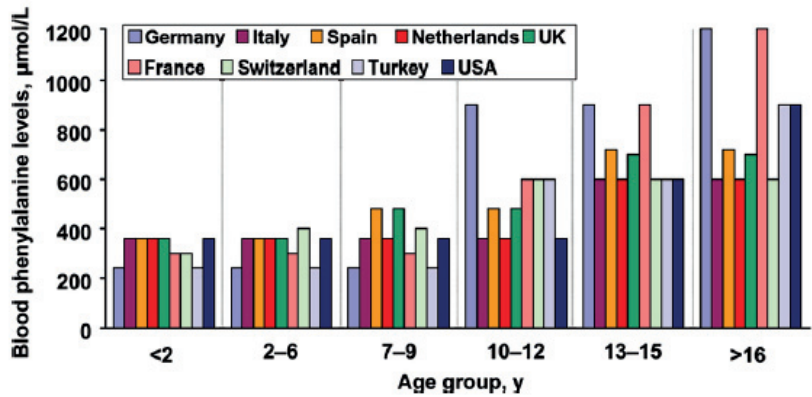


Figura 12: Límites superiores de las concentraciones objetivo de Phe (μmol/L) recomendada para el tratamiento de PKU en diferentes países<sup>26</sup>. (y: years).

Por otra parte, la restricción proteica de la dieta de los pacientes fenilcetonúricos tiene como riesgo principal la aparición de deficiencias nutricionales, de ahí la importancia de realizar una monitorización exhaustiva desde el punto de vista clínico, dietético y analítico. En España se sigue generalmente el Protocolo de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las Hiperfenilalaninemias propuesto por la AECOM en 1998 y actualizado en 2011, que se expone en la Tabla 2 de forma resumida<sup>44,58</sup>.

	0 - 6 meses	6 - 24 meses	> 24 meses	Embarazo
Niveles de Phe	Semanal	Quincenal	Mensual	Semanal
Análítica general	Diagnóstico	Anual	Anual	Inicio y fin
Control clínico	Mensual	Trimestral	Semestral	Mensual
Control neurológico	Cada 2 - 3 años			
Control psicológico	18 meses, 3, 6, 9 años y final (12-14 años)			
RMN cerebral	Sólo si mal control de los niveles de Phe			

Tabla 2. Controles clínicos y bioquímicos recomendados por la AECOM para el seguimiento de pacientes PKU. Los controles pueden verse modificados según la evolución de cada paciente.

Durante los últimos años se ha ido mejorando el contenido, palatabilidad y uso práctico de los suplementos nutricionales necesarios para el tratamiento dietético de estos pacientes, pero al margen de ello, la dificultad para mantener la dieta de forma adecuada ha llevado a buscar nuevos tratamientos que posibiliten el no tener que seguirla de forma tan estricta.

### 2.9.2. Diclorhidrato de Sapropterina

Desde hace pocos años se ha introducido como arma terapéutica en esta enfermedad el diclorhidrato de sapropterina (Kuvan<sup>®</sup>), que es una forma sintética activa de la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), cofactor de la fenilalanina hidroxilasa<sup>23,54-57,59</sup>.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que algunos pacientes afectados de hiperfenilalaninemia secundaria al defecto en la enzima fenilalanina hidroxilasa, y que no presentan un déficit en el metabolismo de la tetrahidrobiopterina ni una deficiencia de ésta, son respondedores al tratamiento con dosis elevadas de BH<sub>4</sub> (20 mg/kg), la cual aumenta la actividad de la fenilalanina hidroxilasa y reduce los niveles de fenilalanina permitiendo un descenso en las restricciones dietéticas<sup>55,59</sup>. No todos los pacientes con deficiencia de fenilalanina hidroxilasa son respondedores a la BH<sub>4</sub>

(aproximadamente un 10-60%) y entre estos pacientes respondedores, hay una amplia variabilidad de respuesta<sup>59</sup>.

Se ha visto que un mayor porcentaje de respondedores corresponde a pacientes con grados de deficiencia de fenilalanina hidroxilasa leve-moderada y en menor número a pacientes con deficiencia severa<sup>55,60,61</sup>. Según un estudio de Fiege y colaboradores<sup>62</sup>, en pacientes con hiperfenilalaninemia leve un 79-83% son respondedores, en pacientes con fenilcetonuria leve lo son un 49-60% y en la PKU clásica sólo responden un 7-10%.

Se piensa que estos pacientes respondedores son portadores de mutaciones de la PAH con actividad residual de la misma, de forma que al añadir concentraciones elevadas del cofactor se corrigen los trastornos de la estabilidad o la cinética de la enzima mutada residual.

Así, el diclorhidrato de sapropterina es el primer fármaco aprobado en el tratamiento de la fenilcetonuria, lo que supone un importante avance en el manejo clínico de esta enfermedad y está indicado en aquellos pacientes con fenilcetonuria respondedores a la  $\text{BH}_4$ <sup>61</sup>, aunque la experiencia muestra que la mayoría de estos pacientes todavía necesitan seguir con algún grado de restricción de proteína natural y usando suplementos bajos en fenilalanina, aunque en menor medida<sup>55</sup>.

Sus efectos secundarios más frecuentes son: cefalea (20%), dolor faringolaríngeo (15%), rinofaringitis (14%), vómitos (13%) y diarrea (10%)<sup>23</sup>.

### **2.9.3. Glucomacropéptido**

Últimamente se ha experimentado con un péptido que está casi libre de fenilalanina, el glucomacropéptido (GMP), un glucofosfopéptido de 64 aminoácidos, que deriva del suero de leche y que tiene un mejor sabor que los sustitutos proteicos. Este péptido puede ser útil junto con la dieta restringida en fenilalanina, siempre y cuando sea fabricado con suficiente pureza como para asegurar que está libre de fenilalanina, ya que ésta podría estar presente como trazas de otras proteínas del suero de la leche, y siempre que se suplementen los

aminoácidos aromáticos ausentes<sup>23</sup>. Es el único péptido conocido de la dieta que no contiene fenilalanina (menos de 2 mg por gramo de proteína) de manera natural en su forma purificada (libre de todos los aminoácidos aromáticos; fenilalanina, tirosina y triptófano)<sup>26</sup>.

Para que constituya una fuente completa de proteínas, el GMP se suplementa con arginina, histidina, leucina, tirosina y triptófano. El GMP comercial se usa como un ingrediente alimentario con una gran variedad de aplicaciones<sup>55,63</sup>.

Algún estudio clínico en pacientes con fenilcetonuria en el que se ha comparado la dieta habitual, basada en el suplemento de aminoácidos sin fenilalanina con la dieta con GMP, no encontró diferencias estadísticamente significativas en la concentración postprandial de fenilalanina<sup>63,64</sup>.

Se están realizando nuevos estudios para evaluar las características metabólicas y nutricionales de las dietas con GMP.

#### **2.9.4. Aminoácidos neutros de gran tamaño**

La suplementación con aminoácidos neutros de gran tamaño (LNAA: triptófano, tirosina, leucina, isoleucina, valina) puede tener un papel en el tratamiento de la PKU, salvo en pacientes embarazadas, ya que no existen datos suficientes para garantizar su seguridad. Su uso se basa en que la fenilalanina y otros LNAA comparten el mismo sistema transportador (LAT1)<sup>65</sup>, creando inhibición competitiva del transporte entre ellos a lo largo de la mucosa intestinal y luego a través de la barrera hematoencefálica.

Por tanto, la suplementación con LNAA contrarresta los efectos a la alta exposición de fenilalanina en el sistema de transporte, lo que podría conllevar la reducción de los niveles hemáticos y cerebrales de Phe en pacientes afectados de PKU, junto con un incremento de la disponibilidad de otros LNAA vitales para la función cerebral normal, como la tirosina<sup>56</sup>.



El papel de los aportes complementarios de LNAA está todavía en estudio y parece que pueden tener resultados prometedores, aunque se desconocen los efectos a largo plazo y la seguridad de este tratamiento.

### **2.9.5. Terapia de sustitución enzimática. Enzima fenilalanina-amonioliasa**

Consiste en el reemplazo de la enzima mutada por un sustituto de proteína recombinante, en este caso la fenilalanina-amonioliasa (PAL). Es una enzima de origen vegetal procedente de las plantas, hongos y cianobacterias, que metaboliza la Phe en compuestos no tóxicos como el ácido transcinámico y el amoníaco (sin sintetizar tirosina). El ácido transcinámico puede ser convertido en ácido benzoico, inocuo para el organismo y que puede eliminarse por vía renal. Las pequeñas cantidades de amoníaco liberadas son fácilmente convertidas en urea.

La enzima PAL es estructural y catalíticamente menos compleja que la PAH, físicamente es más estable y no precisa de un cofactor. Las investigaciones sobre su administración oral o inyectable han sido prometedoras, pero se han encontrado obstáculos como el buscar fórmulas que impidan su degradación intestinal o su inactivación por el sistema inmunitario, por lo que se precisan más estudios que demuestren su utilidad a largo plazo<sup>55,59</sup>.

### **2.9.6. Terapia génica**

En un futuro, otro abordaje podría ser el restablecimiento de la función de la enzima afectada mediante terapia génica, el trasplante de células con función normal del metabolismo fenilalanina/BH<sub>4</sub>. Se han utilizado vectores de adenovirus en estudios murinos con resultados muy esperanzadores. Sin embargo, dado que el vector no se integra en el gen del huésped, el lento recambio hepático hace que la actividad PAH se pierda progresivamente y las reinyecciones no sean efectivas. Por este motivo nuevos ensayos se dirigen a la integración del gen no en hepatocitos, sino en células musculares, cuyo recambio es prácticamente inexistente. Esta aproximación es complicada, ya que no sólo hay que incluir el gen de la PAH, sino el de todo el sistema enzimático de producción de su cofactor, la BH<sub>4</sub>, sin el cual la PAH no es funcional y que no se

encuentra de forma natural en los miocitos. A pesar de esta complejidad, estudios iniciales en ratones demuestran que ésto es posible. Queda un largo camino por recorrer antes de que la terapia génica sea una realidad en la práctica clínica habitual, pero las primeras experiencias en modelos animales son esperanzadoras.

Otra forma de introducir un gen de la PAH normal en un paciente PKU es mediante la transferencia de células hepáticas normales. Aquellos pacientes PKU en los que por otro motivo se realizó un trasplante hepático se curaron de su fenilcetonuria. La agresividad de la técnica y la escasez de órganos hacen que el trasplante hepático no esté indicado para la fenilcetonuria, que por otro lado tiene en la dieta un tratamiento efectivo.

#### **2.9.7. Tratamiento de la HPA secundaria al déficit de BH<sub>4</sub>**

En pacientes con hiperfanilalaninemia secundaria al déficit de BH<sub>4</sub>, la dieta baja en fenilalanina no es efectiva, y una sustitución precoz con precursores de dopamina y serotonina así como el tratamiento con diclorhidrato de sapropterina es crucial para un buen resultado. Los niveles sanguíneos de fenilalanina se normalizan en 4-8 horas tras haber administrado la BH<sub>4</sub> sintética<sup>23</sup>.

#### **2.10. EVOLUCIÓN DE LA PKU**

Es importante controlar los niveles de fenilalanina en sangre tan pronto como sea posible tras el nacimiento y al menos durante los 10 primeros años de vida, cuando el desarrollo del cerebro es más rápido, para conseguir los mejores resultados posibles, pero se recomienda mantener el tratamiento de por vida<sup>26</sup>.

El cumplimiento del tratamiento durante la infancia es mayoritariamente satisfactorio, pero en niños más mayores, adolescentes y adultos la adherencia al tratamiento es más difícil e irregular, dadas las restricciones que conlleva y que interfieren en su vida social, las limitaciones de tiempo y estrés asociados a la preparación de la comida, el mantenimiento de los controles, etc... junto con la ausencia de percepción de perjuicio inmediato<sup>66,67</sup>.

Entre los niños con PKU, aquellos que presentan niveles sanguíneos de fenilalanina más altos de forma persistente presentan más problemas de déficit de atención, disminución del tiempo de reacción, deterioro de las habilidades aritméticas, del desarrollo del lenguaje, de la percepción visual, de las habilidades motoras visuales, del control inhibitorio y de la flexibilidad cognitiva en comparación con otros niños con niveles más bajos de fenilalanina<sup>26</sup>.

Los pacientes afectados de PKU tratados de forma temprana y continua, presentan un cociente intelectual medio menor que individuos no afectados de PKU<sup>26</sup>.

Con respecto al desarrollo, los pacientes que reciben una dieta estricta desde edades tempranas, presentan un crecimiento inferior al de la población sana, con una talla adulta en la mayoría de los casos inferior al p50<sup>68</sup>. Este retraso de crecimiento se mantiene incluso en pacientes respondedores a BH<sub>4</sub>, en los que el aporte de proteínas naturales de la dieta es mayor, tal y como observaron Aldámiz-Echevarría *et al* en dos estudios recientes, el desarrollo de estos pacientes es equiparable al de aquellos que reciben dietas más estrictas<sup>69,70</sup>. En las niñas, se puede producir una aceleración de crecimiento hasta los 8 años de edad, que se traduce en una talla final inferior a la media poblacional<sup>71</sup>.

Por otra parte, a pesar de que el mayor desarrollo del cerebro tiene lugar durante los primeros años de la vida, parece que la interrupción del tratamiento dietético durante la adolescencia conlleva déficits en la función neuropsicológica sutiles, pero medibles durante la vida adulta<sup>23</sup>.

Mientras que son ampliamente conocidos los pobres resultados neurológicos en pacientes afectados de PKU no tratados, hay pocos estudios sobre la posible afectación neurológica en pacientes que inician el tratamiento precozmente y lo mantienen en el tiempo. Algunos han puesto de manifiesto la posibilidad de que estos pacientes desarrollen hiperreflexia o temblor, especialmente después de la adolescencia. Otros problemas neurológicos más severos parece que pueden ser debidos más a la deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> que a las altas concentraciones de Phe en sangre<sup>66</sup>.

En cuanto al comportamiento, existen escasos conocimientos sobre los posibles problemas psiquiátricos en pacientes afectados de PKU, y hay una particular ausencia de datos sobre la neurobiología de esta enfermedad. Algunos hallazgos apuntan hacia la posibilidad de problemas de comportamiento, tendencia a la depresión, ansiedad o tendencias fóbicas. También se han observado comportamientos como el déficit de atención e hiperactividad, sobre todo del primer tipo<sup>66</sup>.

En cuanto a su calidad de vida, algunos estudios muestran menor autonomía, peor autoestima, menor extroversión e impulsividad y sensación de no estar lo suficientemente sano<sup>66</sup> con respecto a personas no PKU, mientras que otros no encuentran estas diferencias<sup>23</sup>.

Dado que se conoce que las consecuencias clínicas para un mismo nivel de fenilalanina en sangre son diferentes para cada paciente adulto, el abordaje del tratamiento en estos pacientes debería ser individualizado. Se precisan más datos sobre el tratamiento en adultos para realizar guías terapéuticas como ya existen para la edad infantil<sup>26</sup>.

Los pacientes diagnosticados de PKU por cribado neonatal en los años 60s-70s, son ahora adultos de mediana edad, por lo que en las siguientes décadas surgirán los primeros estudios en pacientes ancianos tratados precozmente. No se conoce todavía si estos pacientes tendrán más riesgo de desarrollar demencia temprana u otras formas de declive neurológico.

Los efectos de la restricción dietética a largo plazo son difíciles de predecir. Las dietas restrictivas de los pacientes con PKU pueden alterar el estado antioxidante como consecuencia de la deficiencia de selenio o de coenzima Q<sub>10</sub>. Algunos estudios indican que la peroxidación lipídica o el daño del DNA son mayores en pacientes con PKU, incluso cuando los niveles de fenilalanina están bajo control<sup>26</sup>.

La ingesta proteica en pacientes afectados de PKU casi en su mayor parte consiste en fórmulas de aminoácidos libres de fenilalanina y con frecuencia exceden las CDR en la población general, especialmente durante los primeros

años de vida. La ingesta de aminoácidos sintéticos provoca un pico en la concentración de aminoácidos en plasma poco después de su ingesta, lo que conlleva una elevada carga ácida renal, mientras que tras la ingesta de proteína natural las concentraciones plasmáticas de aminoácidos permanecen estables. La proteína de la dieta es un modulador bien conocido de la función renal<sup>72</sup>.

En este sentido, Hennermann *et al*<sup>72</sup> realizaron un estudio en el que encontraron, en los pacientes adolescentes y adultos afectados de PKU estudiados, una alta prevalencia de proteinuria, disminución de la tasa de filtración glomerular, hipercalciuria e hipertensión arterial, ésta última principalmente relacionada con la obesidad, que tiene una elevada prevalencia en los pacientes con PKU<sup>54</sup>. Estas alteraciones podrían deberse a la ingesta de elevadas cantidades de aminoácidos sintéticos, al aumento del estrés oxidativo y al daño local a través de la alta excreción de derivados de la fenilalanina<sup>72</sup>.

Recientemente, Mirás *et al* han puesto de manifiesto que la disminución en la ingesta de proteína natural podría jugar un papel en el desarrollo de enfermedad ósea mineral en pacientes PKU, mientras que los pacientes con terapia con tetrahidrobiopterina, que permite una dieta proteica más laxa, presentarían mejor masa ósea<sup>73</sup>. La determinación periódica de fosfatasa alcalina ósea permitiría identificar a los pacientes con riesgo aumentado de enfermedad mineral ósea<sup>74</sup>.

Se necesitan nuevos estudios longitudinales a largo plazo que precisen el efecto de una dieta con tales restricciones de proteína natural sobre el crecimiento. En diferentes estudios previos mayoritariamente se han encontrado diferencias en el crecimiento en pacientes PKU respecto a sujetos sanos, pero la variabilidad de estos estudios y los pequeños tamaños muestrales, impiden sacar conclusiones definitivas<sup>75</sup>.

Arnold *et al*, encontraron una fuerte correlación entre una menor altura y la menor concentración de prealbúmina, siendo una prealbúmina <20 mg/dL el valor por debajo del cual aparece deterioro del crecimiento<sup>76</sup>.

Se ha puesto de manifiesto en diversos estudios una mayor tendencia a la obesidad en los pacientes PKU, pero se precisan otros nuevos para valorar sus causas y su impacto en la salud de éstos<sup>75</sup>.

Por otra parte, Schulpis *et al*, demostraron que los pacientes que siguen una dieta estricta PKU, presentan unos niveles más bajos de vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y ácido fólico, que conllevan una elevación moderada de la homocisteína en plasma, lo que a su vez correlacionaron con un incremento del riesgo cardiovascular<sup>77</sup>. Por este motivo, los suplementos nutricionales de estos pacientes están enriquecidos con vitaminas del grupo B y ácido fólico.

## 2.11. HOMOCISTEÍNA Y CICLO DE LA METILACION

La homocisteína es un aminoácido azufrado, no esencial, no proteinógeno, que se origina a partir de la metionina, aminoácido esencial que proviene de las proteínas. La homocisteína se halla en una encrucijada de vías metabólicas: la de la trans-sulfuración y la de la remetilación (Figura 13)<sup>78</sup>.

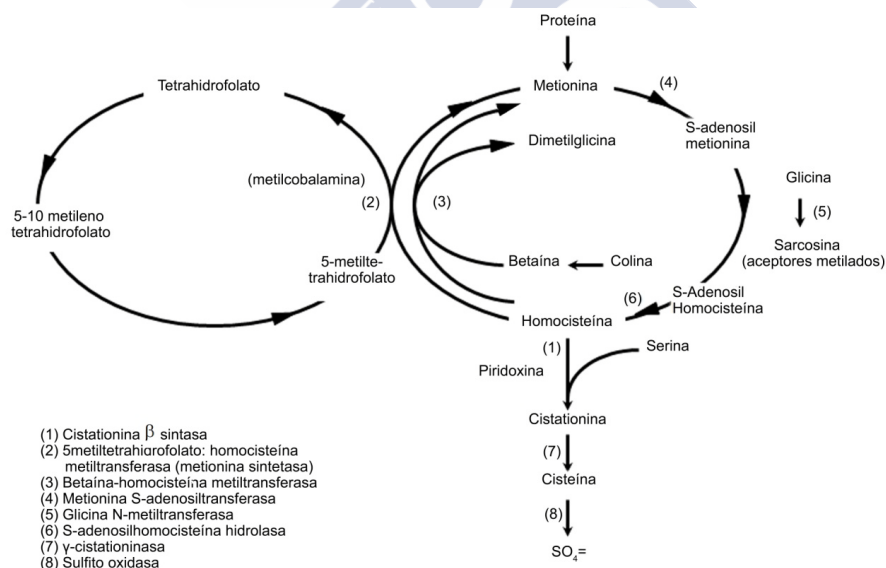


Figura 13. Vía metabólica de los aminoácidos sulfurados. Vía de trans-sulfuración de la metionina y ciclo de la remetilación. Adaptado de Sanjurjo y Baldellou.

Por la vía de la trans-sulfuración, la metionina, a través de la enzima metionina adenosiltransferasa se convierte en S-adenosilmetionina (SAM), que es el principal dador de grupos metilo del organismo. Estas reacciones van a dar lugar a la producción de S-adenosilhomocisteína (SAH), la cual se metaboliza en adenosina y homocisteína por la S-adenosilhomocisteína hidrolasa. La homocisteína se transforma en cistationina mediante la cistationina  $\beta$ -sintetasa, con ayuda del cofactor piridoxal-fosfato. La cistationina a su vez se transforma en cisteína, precursora del glutatión y la taurina, compuestos de gran importancia metabólica como antioxidante (glutatión) y neurotransmisor (taurina). La cisteína es finalmente catabolizada eliminándose por la orina en forma de sulfato.

La homocisteína se puede también remetilar transformándose en metionina por dos vías. La reacción de remetilación más importante es catalizada por la metionina sintetasa (MS), que utiliza como sustrato el metiltetrahidrofolato (MTHF) y debe ser activada por la metionina sintetasa reductasa (MSR). Esta reacción de remetilación requiere metil-cobalamina (MCbl) como coenzima. El MTHF constituye la mayor fuente de folato plasmático y proviene de la reducción de 5,10-metilentetrahidrofolato, catalizada por la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Esta enzima tiene un papel indirecto, pero básico, en la remetilación de la homocisteína. La otra vía de remetilación se localiza principalmente en el hígado y en el riñón, siendo catalizada por la betaína:homocisteína metiltransferasa (BHMT).

El metabolismo de la homocisteína se halla estrechamente regulado por la ingesta de aminoácidos sulfurados. Cuando existe un exceso de metionina debido a una elevada ingesta proteica, la homocisteína es catabolizada por la vía de la trans-sulfuración, transformándose en cisteína y eliminándose por la orina en forma de sulfato. Si la ingesta de metionina es baja, la homocisteína se remetila, formándose metionina y SAM, dador de grupos metilo. Estos grupos metilo actúan en la remetilación de más de 100 metabolitos (DNA, creatina/creatinina, ADMA, hormonas, neurotransmisores)<sup>78</sup>.

Alteraciones en la vía de la trans-sulfuración dan lugar a varios trastornos hereditarios en el metabolismo de los aminoácidos sulfurados, mientras que las alteraciones en la vía de la remetilación están ligadas a los defectos del metabolismo de la cobalamina y el folato. En cualquiera de los casos, la consecuencia bioquímica será una hiperhomocisteinemia. Si existe una alteración genética que condiciona el déficit (total o parcial) de las enzimas implicadas en el metabolismo de la homocisteína, hablaremos de una homocistinuria congénita; hablaremos de una homocistinuria adquirida cuando ésta sea derivada de factores asociados al estilo de vida (vegetarianismo puro), fármacos (antagonistas del ácido fólico, carbamacepina, óxido nítrico, metotrexate, colestiramina, niacina, etc) o ciertas condiciones clínicas (insuficiencia renal, arteriosclerosis)<sup>79-81</sup>.

Los pacientes PKU que siguen un tratamiento dietético, como ya hemos comentado anteriormente, presentan un riesgo de desarrollar un déficit de vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y ácido fólico, lo que a su vez en teoría generaría una homocistinuria adquirida<sup>77</sup>; sin embargo, la restricción proteica y los aportes de B<sub>12</sub> y ácido fólico de los suplementos conllevarían la situación contraria, esto es, una disminución de la homocisteína que se remetilaría a metionina.

## **2.12. DIMETILARGININA ASIMÉTRICA (ADMA)**

La N-N-dimetil-L-arginina asimétrica (ADMA) es un inhibidor competitivo endógeno del grupo enzimático óxido nítrico sintetasa, que cataliza la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina y NO, lo que conlleva una reducción de la producción de NO. Esta competencia se debe a la estrecha similitud entre la composición química de la L-arginina y la molécula de ADMA; la ADMA difiere de la L-arginina en que posee 2 grupos metilos en el grupo amino-terminal de la L-arginina<sup>82</sup>.

### **2.12.1. Formación de ADMA**

La producción de ADMA es debida a la proteólisis de proteínas con residuos de L-arginina metilados. La arginina libre no se metila, sólo se metilan aquellos residuos de L-arginina presentes en las proteínas.



Este proceso de metilación de los residuos L-arginina de las proteínas, es catalizado por medio de un grupo de enzimas denominadas S-adenosilmetionina N-metiltransferasa (PRMTs), proteínas metilasas I y II, debido a que transfieren uno o más grupos metilos desde el donador S-adenosilmetionina, producto intermediario del metabolismo de la homocisteína, a proteínas o polipéptidos con residuos de L-arginina.

Esta reacción produce N-adenosil-L-homocisteína y proteínas metiladas que contienen residuos de L-arginina metilada, y la posterior proteólisis de dichas proteínas con los residuos L-arginina metilados, da lugar a la liberación de tres tipos de compuestos; ADMA, dimetilarginina simétrica (SDMA) y N-monometil-L-arginina (L-NMMA)<sup>82,84</sup>. (Figura 14)

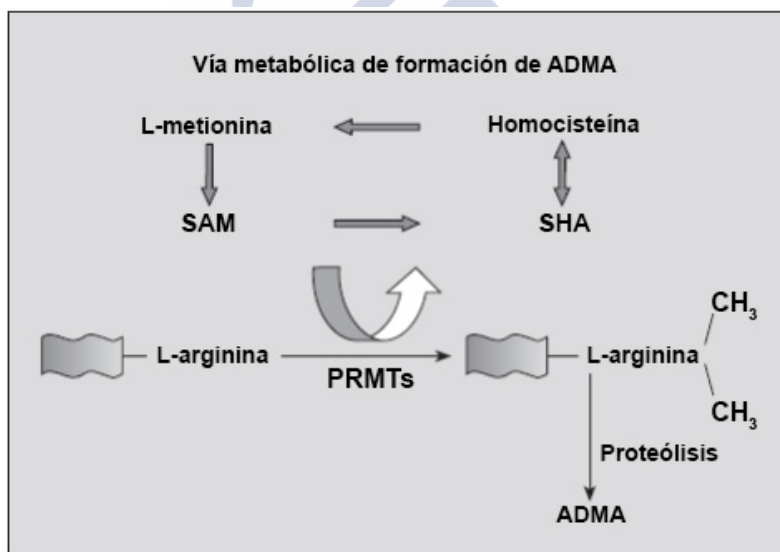


Figura 14. Vía metabólica de formación de la dimetilarginina asimétrica (ADMA). La metilación de las proteínas con residuos de L-arginina se debe a la acción de proteínas metilasas (PRMT), que transfieren grupos metilos desde la S-adenosilmetionina (SAM) a la S-adenosilhomocisteína (SHA), productos intermediarios del metabolismo de la homocisteína. La proteólisis de las proteínas con residuos de L-arginina produce ADMA. (Fuente: Galán *et al*)

El ADMA es el principal producto de la PRMT tipo I, mientras que la tipo II forma SDMA. Ambas son capaces de producir L-NMMA<sup>83,84</sup>.

En condiciones de estrés oxidativo, se puede incrementar la actividad de la PRMT I en las células endoteliales, dando lugar a un aumento en la producción de ADMA<sup>85</sup>.

Concentraciones elevadas de ADMA pueden bloquear la síntesis de NO, molécula antiaterogénica endógena por excelencia, debido a su función reguladora del endotelio vascular. Las disminuciones del NO favorecen la disfunción endotelial causada por factores de riesgo cardiovascular, inflamaciones o alteraciones metabólicas<sup>82</sup> (Figura 15).

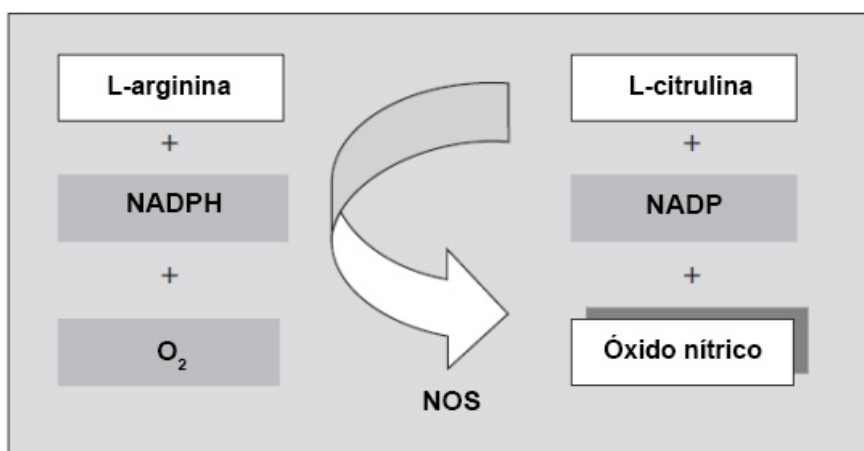


Figura 15. Esquema de la reacción química de la síntesis de óxido nítrico (Galán *et al*). La NOS cataliza la transformación del aminoácido L-arginina en L-citrulina y NO, utilizando como cofactor el NADPH y O<sub>2</sub>.

### 2.12.2. Óxido nítrico

El NO se sintetiza a partir de la L-arginina por medio de la acción de un grupo de enzimas denominado NOS. El NO tiene funciones antiaterogénicas, capacidad de producir vasodilatación, regula la presión arterial, controla el tono vascular y contribuye a mantener la estructura de la pared arterial, produce una inhibición endógena de la agregación plaquetaria (antiagregante y antiadherente plaquetar), frena la proliferación de células de músculo liso en la pared vascular inhibiendo la expresión de proteínas de adherencia (P-selectina para las plaquetas y  $\beta$ -integrinas para los leucocitos), hecho que impide la liberación de factores de

crecimiento capaces de cambiar el fenotipo de las células musculares lisas, de contráctiles a secretoras; reduce la producción de radicales libres ocasionados en los procesos inflamatorios y citotóxicos, con lo que disminuye el estrés oxidativo al neutralizar el radical superóxido de las membranas celulares e inhibe la oxidación de las partículas de LDL, disminuye la formación de placas de atheroma e inhibe la activación leucocitaria, con lo que impide la adhesión de leucocitos y monocitos al endotelio vascular<sup>82,86</sup>.

### **2.12.3. Inhibición de la síntesis de óxido nítrico**

La actividad de la NOS se puede inhibir por el L-NMMA y el ADMA, productos que como se ha comentado anteriormente resultan de la proteólisis de proteínas con residuos de arginina metilados. Estas sustancias se denominan monometilargininas o dimetilargininas, en función de que presenten uno o dos grupos metilos en el grupo aminoterminal de la arginina y pueden detectarse tanto en suero como en orina. En condiciones fisiológicas estos compuestos se encuentran en concentraciones bajas, pero en algunas circunstancias patológicas, pueden llegar a ser suficientemente elevadas como para disminuir la síntesis de NO<sup>82</sup>.

### **2.12.4. Eliminación de ADMA**

La enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH) hidroliza la mayor parte del ADMA en L-citrulina y dimetilamina. La DDAH 1 parece estar involucrada en la regulación de la concentración de ADMA y la DDAH 2 en la concentración local de ADMA. La actividad de la DDAH está disminuida por el estrés oxidativo, lo que conlleva el acúmulo de ADMA. La LDL oxidada, la homocisteína y la hiperglucemia, disminuyen la actividad de la DDAH. La demostración de las acciones biológicas del ADMA y el efecto del estrés oxidativo en la DDAH, ha dado credibilidad al concepto de que el ADMA podría explicar la unión entre los factores de riesgo cardiovascular y la disfunción endotelial. Otra parte del ADMA se elimina en forma de cetoácidos debido a la acción de la enzima dimetilarginina piruvato aminotransferasa<sup>82,84,86</sup>.

Debido a la acción inhibitoria que el ADMA ejerce sobre la NOS, concentraciones elevadas de ADMA bloquean la formación de NO en el endotelio vascular, lo cual provoca alteraciones de éste al disminuir la vasodilatación y favorecer la agregación plaquetaria, la proliferación celular, la oxidación de las LDL, la aparición de radicales libres y otros factores que contribuyen a la formación y progresión del proceso aterosclerótico. Por ello, el ADMA se considera un factor de riesgo cardiovascular<sup>82</sup>.

La reducción en la producción de NO causa disfunción endotelial, vasoconstricción, elevación de la presión arterial, aterosclerosis y progresión de la enfermedad renal<sup>83,84</sup>. En adultos se han observado elevaciones del ADMA en sangre en pacientes con arterosclerosis sistémica, hipercolesterolemia, hipertensión arterial esencial, hipertensión pulmonar, enfermedad renal crónica, diabetes mellitus, enfermedad arterial periférica, enfermedades coronarias, preeclampsia, insuficiencia cardíaca crónica, enfermedad hepática, infarto, hipertiroidismo, resistencia a la insulina y muchas otras alteraciones clínicas<sup>82,83</sup>.

El ADMA se considera un predictor de enfermedades cardiovasculares y muerte en la población adulta<sup>83,84</sup>.

En pediatría los estudios sobre ADMA han sido limitados por el pequeño tamaño de las muestras, aunque varios de ellos han encontrado elevaciones del ADMA en la población pediátrica en diferentes situaciones clínicas. Dentro de la enfermedades metabólicas, se ha visto que en niños con alteraciones congénitas del ciclo de la urea los niveles de ADMA están elevados<sup>83</sup>. También se han observado niveles de ADMA elevados en neonatos pretérmino con ventilación mecánica<sup>84</sup>.

Los niveles de ADMA son muy variables según las diferentes edades. Desde el nacimiento hasta la adolescencia ocurren numerosos cambios fisiológicos en el cuerpo, que pueden influir en este hecho, como que el 20% del ADMA se excreta en orina y la función renal es diferente desde el nacimiento hasta la adolescencia. Durante la niñez los niveles de ADMA son más altos que

en el adulto y disminuyen desde el nacimiento hasta aproximadamente los 25 años de edad, con una media de decrecimiento de 15 nmol por año<sup>83,84</sup>.

Aunque los niveles de ADMA son mayores en neonatos y en la población geriátrica, queda por determinar si la relación entre los niveles normales de ADMA y la edad puede ser atribuida a la función renal.

Además, se ha observado que en personas sanas pueden existir variaciones intraindividuales del ADMA entre un 5 y un 14%<sup>82</sup>. Se precisan más estudios para valorar si hay otros factores que influyan en el valor de ADMA. Se han observado diferencias en los niveles de ADMA en adultos sanos en diferentes trabajos, que pueden ser debidos a la edad, raza, índice de masa corporal o metodología del estudio<sup>84</sup>. Sin embargo, se precisan más ensayos para poder asegurar si estos u otros factores influyen en los niveles de ADMA en la población pediátrica.

Los diferentes métodos de medición de ADMA, producen resultados diferentes estadísticamente significativos. Los métodos habitualmente utilizados para cuantificar la concentración de ADMA son la HPLC y el método de enzimoimmunoanálisis competitivo (ELISA). Aunque el HPLC sea el método de elección, los métodos comercializados de ELISA son más aplicables y alcanzan unos coeficientes de variación aceptables<sup>82</sup>.

Hasta la fecha, no se dispone de un agente específico que reduzca los niveles de ADMA. Diferentes trabajos han informado de que el tratamiento con metformina, anticonceptivos orales, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueadores de los receptores de angiotensina, fenofibratos y ácido  $\alpha$ -lipoico, pueden reducir el nivel de ADMA plasmático, pero permanece la duda de si la reducción de un 10-24% de los niveles de ADMA plasmático inducido por estos agentes en diferentes enfermedades es beneficioso<sup>83-85</sup>.

### 2.12.5. ADMA e Hiperfenilalaninemia

Estudios recientes han puesto de manifiesto que el valor de ADMA en niños con PKU es significativamente menor que en los controles<sup>87-89</sup>, hecho al cual no se le ha encontrado una explicación en la actualidad.

En uno de dichos estudios, Kanzelmeyer *et al*<sup>87</sup> encontraron que la concentración de ADMA en pacientes con fenilcetonuria era significativamente menor que en los controles y que la relación L-arginina/ADMA era similar en los pacientes con fenilcetonuria y en el grupo control, por lo que concluyeron que no les parecía que estuviera alterada dicha vía. También encontraron una correlación negativa entre la concentración de ADMA en plasma y la edad, hallazgo ya puesto anteriormente de manifiesto en otros estudios<sup>83</sup>.

Huemer *et al*, basándose en el hecho de que en la fenilcetonuria el metabolismo proteico está alterado y el estrés oxidativo es elevado, lanzan la hipótesis de que los niveles de ADMA podrían estar elevados en dichos pacientes<sup>88</sup>. Sin embargo, encontraron que el ADMA estaba más bajo que en el grupo control y que la relación L-arginina/ADMA (es decir, la relación entre el sustrato de la síntesis de óxido nítrico y el inhibidor de la misma) estaba significativamente más elevada en pacientes con PKU con respecto al grupo control. No encontraron correlación entre ADMA y la ingesta de proteína natural diaria ni la cantidad de suplementos de aminoácidos<sup>88</sup>.

Sanamaya *et al*<sup>90</sup> también encontraron valores de ADMA bajos en pacientes con PKU. No encontraron una correlación significativa con los valores de fenilalanina en sangre. Sus hallazgos sugieren que la inhibición de la producción de NO por el ADMA está alterado en pacientes con fenilcetonuria.

### 2.13. VÍA ARGININA-GUANIDINOACETATO-CREATINA

Otra de las vías metabólicas de la Arg es la Arginina-Guanidinoacetato-Creatina (Arg-GAA-Cr), que se representa en la Figura 16.

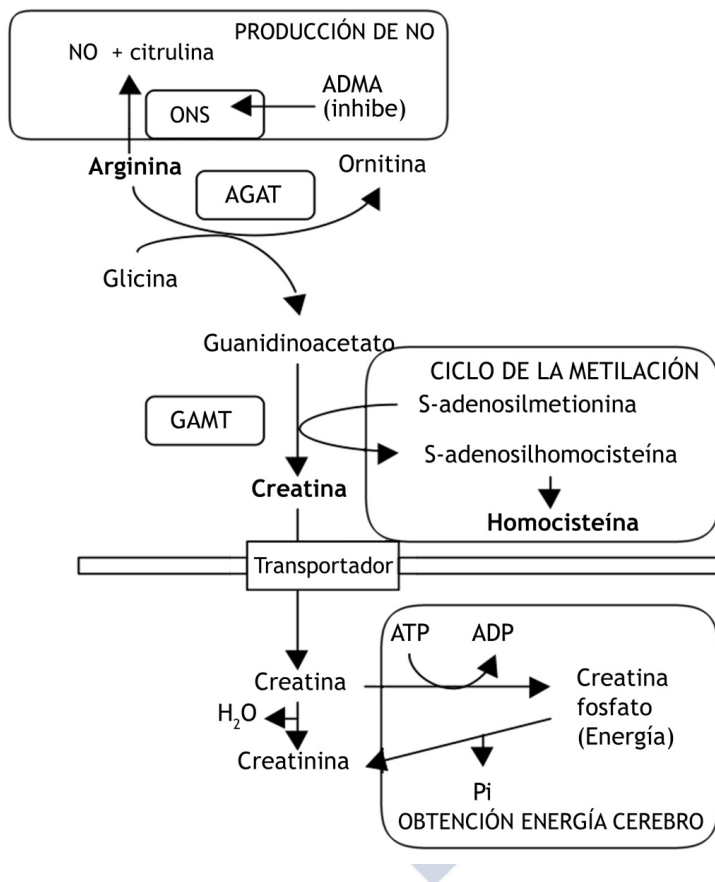


Figura 16. Vía Arg-GAA-Cr. Esta vía está relacionada con el ciclo de la metilación a través del enzima GAMT y de SAM, siendo este último metabolito el que cede los grupos metilos para la conversión de GAA en Cr.

La Arg cede su grupo amidino a la glicina para dar lugar a GAA, reacción catalizada por el enzima L-arginina-glicina amidinotransferasa (AGAT), proceso que ocurre principalmente en el riñón. Posteriormente en el hígado, la metilación de GAA llevada a cabo por la guanidinoacetato metiltransferasa (GAMT) produce Cr, la cual es liberada para su captación por los tejidos. La donación del grupo metilo se produce gracias a la transformación de SAM en SAH (ciclo de la metilación). En los vertebrados, las reservas de Cr se mantienen a través de la

ingesta de Cr en la dieta y del proceso de síntesis de Cr endógeno, mediante los enzimas anteriormente mencionados.

La Cr se transforma en fosfocreatina (PCr), mediante un proceso de fosforilación. Este nuevo metabolito es el que da lugar a la génesis de ATP, el cual es esencial en tejidos con alto consumo de energía, tales como los músculos y el cerebro<sup>91</sup>. El proceso de defosforilación de la PCr produce energía, al convertir ADP en ATP a través de la transferencia de un grupo N-fosforilo desde la PCr al ADP y creatinina (Crn).

Las alteraciones en la ruta biosintética de la Cr se caracterizan por una ausencia o reducción severa de los niveles de Cr en el sistema nervioso central. El defecto de Cr tiene implicaciones a nivel energético y de crecimiento neuronal, por lo que su expresión clínica es principalmente a nivel de retraso madurativo e hipotonía.

La PCr genera energía mucho más rápido que el proceso de glucólisis y posterior fosforilación oxidativa. La expresión celular altamente regulada de la Cr biosintética y los enzimas metabólicos sugieren que la fracción Cr/PCr juega un papel en la homeostasis energética cerebral a través de una relación novel neuron-glial<sup>92</sup>. La Cr y la PCr no sólo juegan un papel energético crucial en el cerebro, sino que, por ejemplo, a nivel ocular, tejido de alto consumo energético, se precisan estos compuestos para la generación de ATP. Incluso el empleo de Cr exógena posee una función neuroprotectora de gran interés<sup>93</sup>.

La metilación del GAA para producir Cr consume más grupos metilo que el resto de reacciones de metilación juntas; por este motivo, en condiciones normales, la síntesis de creatina regula la disponibilidad de grupos metilo para el resto de reacciones, como pueda ser la formación de metionina a partir de homocisteína<sup>94</sup>.





### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1. HIPÓTESIS CONCEPTUAL**

Los pacientes afectados de fenilcetonuria presentan una alteración en el ciclo de la metilación dependiente de la homocisteína, que da lugar a una disminución de la disponibilidad de grupos metilo en las vías dependientes (Arg-ADMA-NO, Arg-GAA-Cr). El tratamiento con BH<sub>4</sub> mejora la donación de metilos.

#### **3.2. HIPÓTESIS OPERATIVA**

La restricción proteica de la dieta de la fenilcetonuria ocasiona una disminución de los niveles de homocisteína y la elevación de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> (por el aporte de suplementos) favorece la remetilación de homocisteína a metionina. Por otro lado, existe un incremento de la trans-sulfuración con aumento de la cisteína. Esta situación da lugar a una menor disponibilidad de grupos metilo para las vías metabólicas relacionadas con la metilación, lo que supone una disminución en la formación de ADMA y una menor metilación del GAA en la vía de la Cr.

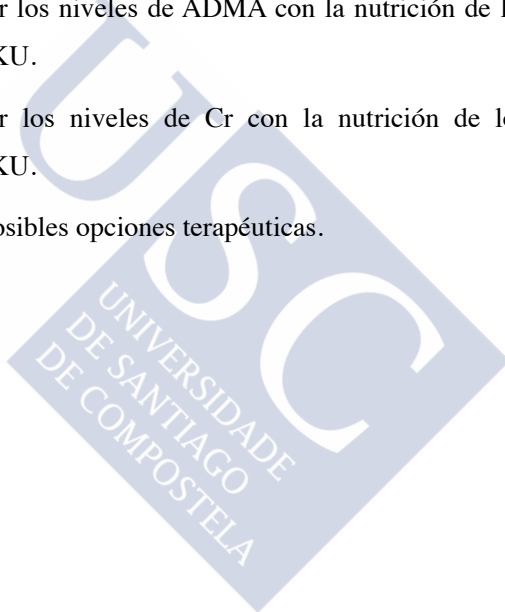
Estas alteraciones se presentan con mayor intensidad en aquellos pacientes que precisan de una dieta estricta, limitada en proteína natural, y con importantes cantidades de suplementos de aminoácidos enriquecidos en vitaminas del grupo B y ácido fólico.

El tratamiento con sapropterina, al permitir un mayor aporte de proteínas naturales y una disminución de los suplementos exentos de fenilalanina que llevan un alto contenido de dichas vitaminas, mejora el ciclo de la metilación.

#### **3.3. OBJETIVOS**

- Principal
  - Valorar el ciclo de la metilación Metionina - Homocisteína en pacientes afectados de PKU.

- Secundarios
  - Valorar la vía metabólica Arg-ADMA-NO en pacientes afectos de PKU.
  - Valorar la vía metabólica Arg-GAA-Cr en pacientes afectos de PKU.
  - Conocer la influencia del tratamiento con  $BH_4$  en estas vías metabólicas.
  - Valorar la relevancia nutricional de los suplementos dietéticos en el ciclo de la metilación.
  - Correlacionar los niveles de ADMA con la nutrición de los pacientes afectos de PKU.
  - Correlacionar los niveles de Cr con la nutrición de los pacientes afectos de PKU.
  - Establecer posibles opciones terapéuticas.





## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos: pacientes de ambos sexos afectados de fenilcetonuria.

Criterios de inclusión:

- Diagnóstico de PKU, confirmado en base a los niveles de fenilalanina en el momento del diagnóstico, a la tolerancia de fenilalanina y a los estudios genéticos.
- Firma del consentimiento informado por parte del paciente o padre/tutor legal.

Criterios de exclusión primaria:

- Padecer una enfermedad crónica o situación inflamatoria asociada que pueda dar lugar a una alteración del estrés oxidativo.
- Haber sufrido trasplante renal, pulmonar o cardíaco.

Grupos de estudio: los pacientes afectados de PKU se dividieron en dos grupos, en función de si tomaban o no dihidrocloruro de sapropterina (Kuvan<sup>®</sup>).

Se estableció también un grupo control con el mismo número de sujetos sanos de similares características de edad, sexo, peso y talla.

Diseño: estudio transversal con recogida de datos durante un período de 12 meses (1 de julio de 2014 a 30 de junio de 2015).

Ámbito del estudio: Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y Unidad de Metabolismo del Hospital Universitario de Cruces.

Tamaño de la muestra: el estudio llevado a cabo por Huemer *et al*<sup>88</sup> mostró diferencias significativas en su variable principal (ADMA) con una población de 16 pacientes afectados de PKU, respecto a la población control. Nosotros, en base a nuestra casuística (más de 100 pacientes HPAB/PKU), establecimos un tamaño muestral de 40 pacientes.

Planificación: la información relativa al estudio se les proporcionó a los sujetos afectos de PKU en el momento de acudir a la consulta, dentro del protocolo de rutina que está establecido con objeto de hacer un seguimiento de su patología. Si los pacientes accedían a participar se les solicitaba que firmaran el consentimiento informado. En el caso de los menores de 12 años, el consentimiento fue firmado por los padres/tutor legal. En el caso de los menores de edad por encima de 12 años, además de la firma de los padres/tutor legal se requirió el consentimiento del menor. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Cruces y por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Santiago.

Se obtuvo una muestra de orina (5 mL) y una muestra de sangre por venopunción (1 tubo EDTA, 2 mL) en situación de ayuno de 10-12 horas en una de las visitas rutinarias que realizaban los pacientes al hospital. Inmediatamente después de la extracción, las muestras de sangre se centrifugaban (4.000 g, 4 °C, 10 min) con objeto de separar la fracción plasmática de la fracción de hematíes. La fracción de plasma se dividía en alícuotas de 300  $\mu$ L. Estas alícuotas, junto con la fracción de hematíes y la orina, se almacenaban a -80°C hasta su posterior uso. Asimismo, se llevó a cabo el estudio clínico de los pacientes, recogiendo datos antropométricos, nutricionales y medición de la tensión arterial.

Las muestras de sangre (previa centrifugación) y orina recogidas por el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, se almacenaban a -80°C hasta su posterior envío a la Unidad de Metabolismo del Hospital Universitario de Cruces, para lo que se empleó nieve carbónica con objeto de mantener las muestras congeladas durante el transporte.

Se informó al Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Universitario de Cruces del rango de edades que presentaba el grupo de pacientes reclutado y de la distribución de géneros, peso y talla en este grupo, con objeto de que reclutaran sujetos sanos pareados por edad, sexo, peso y talla. Estos niños eran básicamente sanos con cirugías programadas para corrección de alteraciones menores. Cuando los sujetos acudían a la consulta preoperatoria, se les



proporcionaba la información sobre el estudio, y en el supuesto de que desearan participar, se les pedía que firmaran el consentimiento informado, o en el caso de los sujetos menores de edad, que lo firmaran los padres/tutor legal. Una vez recogidas las muestras, el Servicio de Cirugía las hacía llegar a la Unidad de Metabolismo para someterlas al tratamiento anteriormente descrito.

Los estudios genéticos se realizaron mediante análisis de DNA de los pacientes, para lo cual se obtuvo una muestra de 3 mL de sangre en EDTA, extraída en uno de los controles analíticos habituales de cada paciente.

El análisis genético se llevó a cabo en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM), de la Universidad Autónoma de Madrid, usándose electroforesis de gel de gradiente de desnaturalización (DGGE) y secuenciación directa a través del kit BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems®) y electroforesis capilar con el analizador genético ABI Prism 3700 (Applied Biosystems®).

Todas las muestras de los pacientes en las que sólo se identificaba una mutación causal tras la secuenciación de todos los exones de la PAH, fueron sometidas a análisis MLPA (SALSA MLPA P055 PAH Probemix, MRC-Holland), para descartar deleciones largas o duplicaciones.

Se comprobó la actividad residual de la PAH para cada mutación a través de las bases de datos recogidas en la PAHdb ([www.pahdb.mcgill.ca](http://www.pahdb.mcgill.ca)) y/o en la BH<sub>4</sub>db ([www.bh4.org](http://www.bh4.org)).

## **4.1. VARIABLES DEL ESTUDIO**

### **4.1.1. Variable principal:**

El ciclo de la metilación, basado en los parámetros homocisteína, metionina y cisteína en plasma.

La determinación de homocisteína se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia de polarización (Architect Homocysteine Reagent Kit, Abbott®)

La metionina y la cisteína se detectaron mediante un cromatógrafo iónico Biochrom 30, equipado con precolumna y columna cromatográfica intercambiadora de iones litio Ultropak 8. El pH de la fase móvil se fue aumentando de forma progresiva durante el tiempo de análisis. Tras la separación cromatográfica, se llevó a cabo una derivatización postcolumna con ninhidrina, monitorizándose la absorbancia a 570 y 440 nm. La identificación y la cuantificación se realizaron por comparación con los tiempos de retención y las áreas de pico de un patrón de aminoácidos de composición y concentración conocidas (Sigma).

#### **4.1.2. Variables secundarias:**

##### ***4.1.2.1. Antropometría***

El peso y la talla se obtuvieron en la consulta una vez firmado el consentimiento informado. En los menores de 24 meses se determinó la longitud en supino a través de un infantómetro con dos bases, una fija que se orienta en la cabeza y una movable a nivel de los pies; el peso a esta edad se midió con báscula manual para lactantes. A partir de los 24 meses se determinó la talla de pie con un tallímetro de pared, y el peso corporal con básculas digitales con una precisión de 100 g. Los pacientes se pesaban descalzos, sin ropa y por la mañana tras ayuno nocturno. Las mediciones fueron realizadas, en cada centro, siempre por el mismo personal experimentado.

También se recogió el grado de desarrollo sexual (de acuerdo con la valoración de las características sexuales externas primarias y secundarias que establece la escala de Tanner).

El estado nutricional fue evaluado mediante el cálculo del índice de masa corporal (IMC) mediante la fórmula  $IMC = \text{peso} / \text{altura}^2$  ( $\text{Kg/m}^2$ ). Los pacientes mayores de 18 años se clasificaron como bajo peso ( $IMC < 18,5$ ), peso normal ( $IMC 18,5-24,99$ ), sobrepeso ( $IMC 25-29,99$ ) y obesidad ( $IMC \geq 30$ ) de acuerdo con los criterios de la OMS (Organización Mundial de la Salud). Los pacientes menores de 18 años se clasificaron de acuerdo al IMC siguiendo los criterios de

la OMS para el desarrollo infantil (bajo peso: IMC en percentil <15; peso normal: IMC en percentiles 15-85, sobrepeso: IMC en percentiles 85-95, obesidad: IMC en percentil >95)<sup>95,96</sup>. Se obtuvieron los correspondientes Z-score de talla, peso e IMC. Para ello, los valores obtenidos de los pacientes reclutados se compararon con los de la población general (Carrascosa *et al*<sup>97</sup>, [www.webpediatria.com/endocrinoped/antropometria.php](http://www.webpediatria.com/endocrinoped/antropometria.php)).

#### **4.1.2.2. Variables de control de PKU - nutrición**

De acuerdo al protocolo establecido para el seguimiento de los pacientes afectados de PKU<sup>58</sup>, la medida de los niveles de fenilalanina en sangre se emplea como variable que refleja el cumplimiento por parte de los pacientes de la dieta prescrita. Como variable adicional que refleja el buen control metabólico del paciente, se realizó una mediana de los niveles de fenilalanina en sangre de los 12 meses previos a la inclusión del paciente en el estudio (Índice de Control Dietético -ICD-). Se consideraron niveles adecuados de Phe en sangre en niños menores de 6 años <360  $\mu\text{mol/L}$ , entre 6 y 10 años <480  $\mu\text{mol/L}$  y  $\leq 600$   $\mu\text{mol/L}$  en los mayores de esa edad.

Por otro lado, de acuerdo al planteamiento que se ha realizado en el estudio, se llevó a cabo un control de la dieta de los pacientes. Para ello se solicitó a los pacientes o padres/tutores legales que anotaran las cantidades exactas de los alimentos ingeridos en los tres días posteriores a la inclusión del sujeto en el estudio.

**La encuesta dietética** se recogía en la siguiente visita a la consulta que los pacientes tenían concertada. Posteriormente, el cálculo de las cantidades de proteína total (g/kg), proteína natural (g/kg), proteína proveniente del suplemento (g/kg) y fenilalanina (mg/kg) ingeridas por cada paciente se efectuaron con ayuda del programa dispuesto a tal efecto en la página web [www.odimet.org](http://www.odimet.org).

En los casos en los que los pacientes estuvieran tomando sapropterina (Kuvan<sup>®</sup>), se anotó la dosis diaria que tomaban (mg/kg) y la fecha de inicio del tratamiento.

**Variables bioquímicas:**

Se determinaron los niveles de prealbúmina, como marcador nutricional, así como un análisis bioquímico que incluyera los valores de glucosa, insulina, vitamina D, calcio, selenio, zinc, proteínas totales, ácido úrico, colesterol, triglicéridos y transaminasas (GOT, GPT, GGT). Se consideraron los valores de referencia de los Laboratorios del Hospital de Cruces y de Santiago de Compostela, que son equiparables, así como los considerados como valores de referencia para los pacientes afectos de PKU para los siguientes parámetros: selenio (60-125 µg/L), vitamina D (20-42 ng/mL) y prealbúmina (21-41 mg/dL). Los análisis de bioquímica se obtuvieron en ayunas, a la misma hora (8 de la mañana) y los pacientes se encontraban asintomáticos y no estaban recibiendo ninguna medicación (salvo la sapropterina). Los procedimientos fueron los habituales de cada centro.

**Análisis de otros aminoácidos en plasma:**

Se realizó un análisis completo de los perfiles de aminoácidos en plasma, haciendo especial hincapié, además de lo referido, en las concentraciones de glicina, ornitina, arginina y citrulina. La técnica empleada fue la misma que la ya descrita para la determinación de metionina y cisteína.

**4.1.2.3. Valoración de los trastornos de la vía Arg-ADMA-NO****Determinación de ADMA y SDMA en plasma**

La preparación de la muestra implica la adición de los estándares internos a la muestra de plasma y posterior eliminación de las proteínas mediante un proceso de ultracentrifugación. A pesar de que habitualmente la determinación de ADMA/SDMA en sangre se acomete mediante el empleo de un kit ELISA<sup>98</sup>, el método es laborioso, costoso y en ocasiones poco sensible en las medidas. Por ello, utilizamos una nueva metodología para la cuantificación de dicho metabolito y sus isómeros, empleando cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro tandem masas (LC-MS/MS).

La columna cromatográfica usada para facilitar la separación del ADMA/SDMA de otros metabolitos que puedan interferir en su medida es de tipo C<sub>18</sub>. Dada la polaridad del analito, se efectuó un gradiente con objeto de establecer las mejores condiciones de separación cromatográfica. La monitorización del ADMA/SDMA se realizó a través del espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. El primer cuadrupolo fragmentó los diferentes analitos presentes en la muestra en iones de masas diferentes, que fueron distinguidos en función de su cociente masa/carga en el segundo cuadrupolo o célula de colisión. El tercer cuadrupolo efectuó un segundo proceso de fragmentación sobre los iones seleccionados en el segundo cuadrupolo. De esta forma, las dimetilargininas quedaron inequívocamente identificadas por el ión hijo resultante en el tercer cuadrupolo, siendo así posible su cuantificación<sup>99</sup>.

#### ***4.1.2.4. Valoración de los trastornos de la vía Arg-GAA-Cr***

##### **Determinación de GAA y creatina en plasma**

La determinación de GAA y Cr en plasma se realizó mediante LC-MS/MS. La preparación de la muestra implica la adición de los estándares internos marcados isotópicamente a la muestra de plasma. Tras la precipitación de las proteínas con acetonitrilo, el sobrenadante se trasvasa a un vial para ser evaporado hasta sequedad. Tras derivatización con ácido clorhídrico en butanol, se vuelve a evaporar para reconstituir en fase móvil. La cuantificación se llevó a cabo en el modo MRM (multiple reaction monitoring) del LC-MS/MS.

##### **Determinación de creatinina en orina**

La determinación de Crn en orina se llevó a cabo mediante LC-MS/MS. La preparación de la muestra implica la adición de los estándares internos marcados isotópicamente a la muestra y dilución con agua. La cuantificación de la Crn se llevó a cabo en el modo MRM del LC-MS/MS.

##### **Determinación de la creatinina en plasma**

Se llevó a cabo en el laboratorio de bioquímica de acuerdo con el procedimiento estándar.

#### ***4.1.2.5. Valoración bioquímica para completar el estudio del ciclo de la metilación***

Determinación de vitamina B<sub>12</sub> y ácido fólico, con las técnicas habituales de laboratorio empleando Advia Centaur XP Analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Germany).

Niveles de ácido metilmalónico (MMA) en orina. En la primera orina de la mañana, una vez derivatizado se determinó por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).

## **4.2. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS**

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS 22.0. Se utilizó la media y la desviación estándar para las variables cuantitativas, si presentaban una distribución simétrica sin valores extremos. En caso contrario, se utilizó la mediana, rango y rango intercuartílico. Para las variables cualitativas, se utilizaron frecuencias relativas. Se determinó el ajuste de las variables a la normalidad. Para la comparación estadística de variables categóricas se aplicó la prueba Chi-cuadrado, en el caso de variables cuantitativas se aplicaron las pruebas t-Student para datos pareados y T de Wilcoxon. Para correlacionar diferentes parámetros se utilizaron los coeficientes de correlación de Pearson y Spearman y el análisis de regresión múltiple.



## **5. RESULTADOS**





## 5. RESULTADOS

Durante el período de estudio (1 de julio de 2014 a 30 de junio de 2015) se recogieron los datos de 42 pacientes diagnosticados de PKU y de 42 controles, con una distribución similar en cuanto a sexo, edad, peso y talla.

De los pacientes afectados de PKU, 19 son mujeres (45,24%) y 23 hombres (54,76%). La edad media fue de 13,43 años (6 meses – 43 años). Con respecto al tipo de PKU, 23 casos son formas clásicas, 16 moderadas y 3 leves. El diagnóstico fue realizado de forma precoz en todos los casos menos en 6 (14,3%). Todos los pacientes reciben tratamiento dietético y 9 (21,43%) reciben también tratamiento con BH<sub>4</sub> (Figura 17). En la Tabla 3, se presentan las características generales de los pacientes PKU y de los controles.

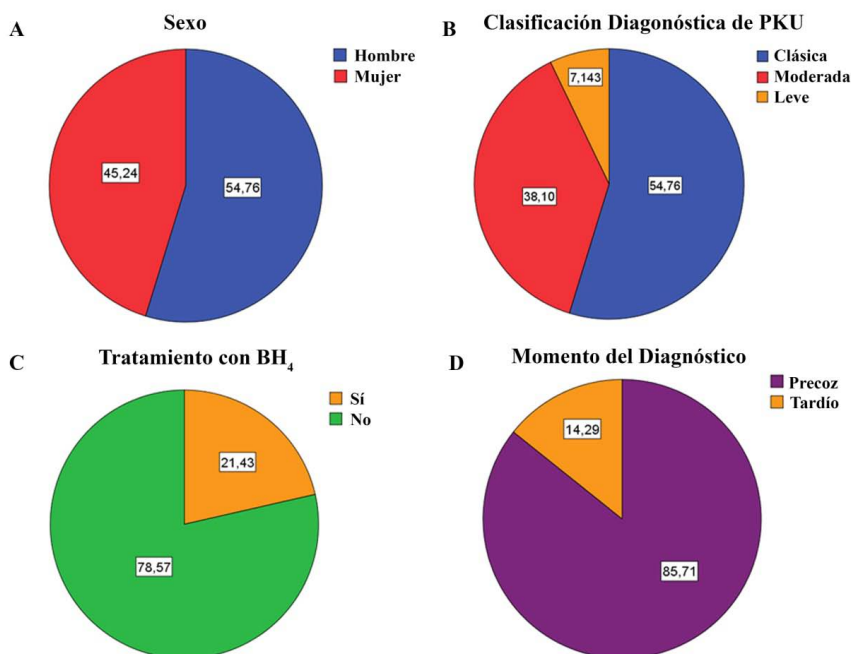


Figura 17. Distribución de la muestra PKU en función de: sexo (A), clasificación diagnóstica (B), tratamiento con BH<sub>4</sub> (C) y momento del diagnóstico (D).

	<i>PKU</i>	<i>Controles</i>
PKU Clásica	23	-
PKU Moderada	16	-
PKU Leve	3	-
Sexo (F/M)	19/23	21/21
Edad (años)	13 [0,5 ; 43]	11,5 [1 ; 39]
Z-score Peso	-0,04 [-1,8 ; 2,3]	-0,05 [-1,7 ; 2,5]
Z-score Talla	-0,8 [-2,3 ; 1,1]	-0,9 [-2,3 ; 1,4]
Z-score IMC	0,4 [-1,4 ; 2,4]	0,5 [-1,3 ; 2,5]

Tabla 3. Características generales de los pacientes PKU y de los controles.  
(F = femenino, M = masculino)

Los parámetros antropométricos de los pacientes PKU aparecen resumidos en las Tablas 4 y 5, junto con la clasificación de los pacientes en función de su IMC, de acuerdo con los criterios de la OMS.

	<i>Peso (Kg)</i>	<i>Peso Z-score</i>	<i>Talla (cm)</i>	<i>Talla Z-score</i>	<i>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</i>	<i>IMC Z-score</i>
<i>Media</i>	39,5	-0,04	129,5	-0,8	20,6	0,4
<i>Mínimo</i>	7	-0,9	63	-2,4	15,2	-1,5
<i>Máximo</i>	98	2,3	184	1,1	35,7	2,4
<i>Percentil 3</i>	7,5	-1,8	66	-2,3	15,2	-1,4
<i>Percentil 97</i>	94,2	2,3	180,7	1,1	34,1	2,4

Tabla 4. Resumen de los parámetros antropométricos de la muestra (peso, talla e IMC) con sus Z-score correspondientes.

	<i>Bajo Peso</i>	<i>Peso normal</i>	<i>Sobrepeso</i>	<i>Obesidad</i>
Nº de pacientes	3	21	17	0
Porcentaje (%)	7,3	51,2	41,5	0

Tabla 5. Clasificación de los pacientes en función de su IMC.

Se llevó a cabo estudio genético en los pacientes PKU. Las mutaciones encontradas, el fenotipo y si reciben tratamiento con clorhidrato de sapropterina por respuesta a la sobrecarga de  $\text{BH}_4$ , se resumen en la Tabla 6.

Paciente	Sexo	Fenotipo PKU	Alelo 1	Alelo 2	Tratamiento con Kuvan®
1	F	Moderada	c.1066-11G>A IVS10nt-11G>A	c.204A>T p.R68S	Si
2	M	Clásica	c.1045T>C p.S349P	c.1066-11G>A IVS10nt-11G>A	No
3	M	Moderada	c.526C>T p.R176X	c.728C>T p.P244L	No
4	M	Clásica	c.727C>T p.R243X	c.1068C>G p.Y356X	No
5	M	Clásica	c.727C>T p.R243X	c.353-22C>T IVS3-22C>T	No
6	F	Clásica	c.781C>T p.R261X	c.781C>T p.R261X	No
7	F	Clásica	c.727C>T p.R243X	c.1066-11G>A IVS10nt-11G>A	No
8	F	Clásica	c.838G>A p.E280K	c.838G>A p.E280K	No
9	M	Clásica	c.838G>A p.E280K	c.838G>A p.E280K	No
10	M	Clásica	c.727C>T p.R243X	c.1066-11G>A IVS10nt-11G>A	No
11	M	Moderada	c.204A>T p.R68S	c.115_117delTTC p.F39del	No
12	F	Leve	c.727C>T p.R243X	c.527G>T p.R176L	No
13	M	Clásica	c.194T>C p.I65T	c.1066-11G>A IVS10nt-11G>A	No
14	M	Clásica	c.1066-11G>A IVS10nt-11G>A	c.809G>A p.R270K	No
15	M	Clásica	c.782G>A p.R261Q	c.1066-11G>A IVS10nt-11G>A	No
16	F	Clásica	c.1066-11G>A IVS10nt-11G>A	c.1066-11G>A IVS10nt-11G>A	No
17	F	Moderada	c.473G>A p.R158Q	c.782G>A p.R261Q	No
18	M	Clásica	c.473G>A p.R158Q	c.782G>A p.R261Q	No
19	F	Leve	c.143T>C p.L49S	c.527G>T p.R176L	No

Paciente	Sexo	Fenotipo PKU	Alelo 1	Alelo 2	Tratamiento con Kuvan®
20	F	Clásica	c.1066-11G>A IVS10nt-11G>A	c.781C>T p.R261X	No
21	F	Moderada	c.143T>C p.L49S	c.1162G>A p.V388M	Sí
22	F	Moderada	c.194T>C p.I65T	c.1162G>A p.V388M	No
23	F	Moderada	c.782G>A p.R261Q	c.1241A>G p.Y414C	Sí
24	F	Clásica	c.781C>T p.R261X	c.1315+1G>A IVS12ds	No
25	F	Moderada	c.194T>C p.I65T	c.1217T>C p.I406T	No
26	F	Leve	c.194T>C p.I65T	c.1162G>A p.V388M	No
27	F	Clásica	c.1162G>A p.V388M	c.913-7A>G IVS8-7A>G	No
28	F	Clásica	c.136G>A p.G46S	c.782G>A p.R261Q	No
29	F	Clásica	c.1162G>A p.V388M	c.194T>C p.I65T	No
30	F	Clásica	c.754C>T p.R252W	c.527G>T p.R176L	No
31	M	Moderada	c.143T>C p.L49S	c.194T>C p.I65T	Sí
32	M	Moderada	c.1162G>A p.V388M	c.1162G>A p.V388M	Sí
33	M	Moderada	c.734T p.V245G	c.1211C>T p.T404I	No
34	M	Clásica	c.782G>A p.R261Q	c.1066-11G>A IVS10nt-11G>A	No
35	M	Moderada	c.441+5G>T IVS4+5G>T	c.441+5G>T IVS4+5G>T	No
36	M	Moderada	No encontrada	c.838G>A p.E280K	Sí
37	M	Moderada	c.1045T>C p.S349P	c.204A>T p.R68S	Sí
38	M	Clásica	c.194T>C p.I65T	c.47_48delCT p.S16X	No
39	M	Moderada	c.1066(-3)C>T IVS10nt-3C>T	c.1222C>T p.R408W	Sí
40	M	Moderada	c.1162G>A p.V388M	c.842C>T p.P281L	Sí
41	M	Clásica	c.1066-11G>A IVS10nt-11G>A	c.782G>A p.R261Q	No
42	M	Clásica	c.1315+1G>A IVS12+1G>A	c.1315+1G>A IVS12+1G>A	No

Tabla 6. Resumen de las mutaciones encontradas en los pacientes PKU. Las variantes han sido nombradas con respecto a la secuencia de referencia NM\_000277. Los pacientes 1-19 son de la Comunidad Autónoma de Galicia, los pacientes 20-42 pertenecen a la Comunidad Autónoma del País Vasco.

A continuación, se presentan los parámetros analizados para la valoración del control de la enfermedad. En la Tabla 7 se refleja el resumen de los datos dietéticos en cuanto a la mediana de Phe en el último año, ingesta de proteínas totales, naturales y procedentes de suplementos por kg de peso y día, así como la tolerancia de Phe en los pacientes PKU. El rango de referencia para la población general con respecto a la ingesta de proteínas totales estaría entre 0,8 y 1,3 g/Kg/día; en los pacientes PKU, tal y como se refleja en dicha tabla, esta ingesta es de  $1 \pm 0,5$  g/Kg/día, de forma que los pacientes PKU reciben un 117% de la CDR. Sin embargo, la ingesta de proteínas naturales es un 48% de la CDR.

	<i>Media (<math>\pm</math>DE)</i>	<i>P<sub>3</sub>-P<sub>95</sub></i>	<i>Porcentaje de pacientes &lt;P<sub>3</sub></i>	<i>Porcentaje de pacientes &gt;P<sub>95</sub></i>
Mediana Phe en el último año ( $\mu$ mol/L)	437 $\pm$ 340	117-1.230	10	2,5
Proteínas totales (g/Kg/día)	1 $\pm$ 0,5	0,17-1,9	0	5
Proteínas naturales (g/Kg/día)	0,6 $\pm$ 0,5	0,15-1,9	0	2,5
Proteínas procedentes de suplemento (g/Kg/día)	0,4 $\pm$ 0,4	0-1,3	0	2,5
Tolerancia Phe (mg/día)	651 $\pm$ 468	121-2.025	0	7,5

Tabla 7. Valoración del control de la enfermedad en los pacientes PKU de nuestra muestra a partir de los parámetros metabólico-dietéticos.

Dentro de la muestra de pacientes PKU, queremos destacar dichos parámetros de control de la enfermedad para el subgrupo de pacientes que reciben tratamiento con BH<sub>4</sub> (Tabla 8). Podemos ver cómo la mediana de Phe en estos pacientes está considerablemente más baja, y cómo el consumo de proteínas totales y de proteínas naturales es superior al del total de la muestra.

	Media ( $\pm$ DE)	P <sub>3</sub>
Mediana Phe en el último año ( $\mu$ mol/L)	286 $\pm$ 227	132
Proteínas totales (g/Kg/día)	1 $\pm$ 0,5	0,17
Proteínas naturales (g/Kg/día)	0,8 $\pm$ 0,4	0,17
Proteínas procedentes de suplemento (g/Kg/día)	0,23 $\pm$ 0,2	0
Tolerancia Phe (mg/día)	882,3 $\pm$ 503	312

Tabla 8. Parámetros de control de la enfermedad en los 9 pacientes tratados con BH<sub>4</sub>.

El adecuado cumplimiento dietético se determina en función de la mediana de Phe en el último año y la edad del paciente. La distribución de los pacientes PKU en base a este parámetro se refleja en la Tabla 9. El cumplimiento es en general adecuado, siendo el grupo de mayor transgresión dietética el de los pacientes mayores de 10 años que no reciben tratamiento con BH<sub>4</sub>.

Edad <6 años (Phe <360 $\mu$ mol/L)		Edad 6-10 años (Phe <480 $\mu$ mol/L)		Edad >10 años (Phe $\leq$ 600 $\mu$ mol/L)	
No BH <sub>4</sub>	BH <sub>4</sub>	No BH <sub>4</sub>	BH <sub>4</sub>	No BH <sub>4</sub>	BH <sub>4</sub>
15/15 (100%)	-	3/3 (100%)	2/2 (100%)	8/15 (53%)	6/7 (86%)

Tabla 9. Distribución de los pacientes PKU según la mediana de Phe de acuerdo a cada rango de edad. Los porcentajes se refieren al total de pacientes en cada grupo.

En la Tabla 10, se reflejan los datos del perfil nutricional, glucolipídico y bioquímico de los pacientes PKU. Se señalan los valores de referencia considerados normales, el porcentaje de pacientes que presentan valores por encima o por debajo del rango de normalidad establecido para cada parámetro analítico y el porcentaje de pacientes que se encuentra en los extremos superior o inferior (según proceda) de la distribución. Podemos apreciar que los niveles de prealbúmina, 25-OH-vitamina D, selenio, HDL colesterol y LDL colesterol se encuentran por debajo del rango de normalidad en un porcentaje significativo de los pacientes.

	PKU x [ $P_3$ - $P_{97}$ ]	Rango de referencia	% de pacientes con parámetros fuera de rango		% de pacientes con percentiles fuera de rango	
			↓	↑	< $P_3$	> $P_{97}$
Prealbúmina (mg/dL)	22,6 [11,2-53,1]	21-41	60,7	5	15	2,6
Proteínas totales (g/dL)	7,2 [6-7,8]	6-8	2,4	2,4	0	0
Ca (mg/dL)	9,7 [9-10,9]	8,1-10,8	0	0	0	0
25-OH vitamina D (ng/mL)	28 [14-72]	20-42	13,5	8	55	2,5
Se (µg/L)	68 [33-91]	60-125	35	0	21	0
Zn (µg/dL)	83 [66-116]	65-140	0	0	2,5	0
Colesterol (mg/dL)	145 [76-240]	100-240	2,6	2,6	2,5	0
Triglicéridos (mg/dL)	72 [31-379]	30-170	0	2,6	0	2,5
HDL-colesterol (mg/dL)	50 [30-74]	>40	13	-	13	0
LDL-colesterol (mg/dL)	89 [39-125]	<130	-	0	60	0
Glucosa (mg/dL)	83 [59-103]	70-110	1	2,5	2,5	0
Insulina (g/L)	8,7 [0,8-29,2]	3,2-16,3	23	0	0	13
GOT - AST (U/L)	29,5 [16-103,7]	5-56	0	2,5	0	2,5
GPT - ALT (U/L)	20 [12-81,4]	5-47	0	2,5	0	2,5
GGT (U/L)	12 [5-48]	2-40	0	2,5	0	2,5
Creatinina (mg/dL)	0,4 [0,1-1]	0,1-1,1	-	0	0	0

Tabla 10. Perfil nutricional, glucolipídico y bioquímico de los pacientes PKU. Las cifras en azul destacan el porcentaje de pacientes que se encuentran por debajo del rango de normalidad y del  $P_3$ . (Ca = Calcio; Se = selenio; Zn = Zinc).

Cuando valoramos los distintos parámetros metabólico-nutricionales en los pacientes PKU en función de recibir o no tratamiento con  $\text{BH}_4$ , no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los niveles de: vitamina D, calcio, selenio, zinc, colesterol, triglicéridos, HDL, LDL, ácido úrico, GOT, GPT, GGT, glucosa ni insulina.

Al analizar lo que ocurre con el perfil de aminoácidos, vemos cómo los niveles de arginina, citrulina y metionina se encuentran disminuidos en los pacientes PKU con respecto a los controles, aunque sólo son significativos para la arginina, mientras que los niveles de glicina, ornitina y cisteína se encuentran significativamente elevados. Los niveles de fenilalanina se encuentran, naturalmente, elevados (Tabla 11).

Aminoácido ( $\mu\text{mol/L}$ )	Media en el grupo control	Media en el grupo PKU	Significación estadística
Fenilalanina	57,57	415,62 (↑)	<0,001
Arginina	89,47	49,89 (↓)	<0,001
Glicina	217,55	280,83 (↑)	<0,001
Citrulina	31,55	29,59 (↓)	ns
Ornitina	46,54	61,28 (↑)	0,001
Metionina	24,74	22,36 (↓)	ns
Cisteína	17,21	33,92 (↑)	<0,001

Tabla 11. Diferencias en el perfil de aminoácidos de los pacientes PKU con respecto a la población control. En azul se destacan los valores elevados, y en verde los disminuidos. (ns = no significativo).

Cuando se estratifica a los pacientes en función del tratamiento con  $\text{BH}_4$ , no se encuentran diferencias estadísticamente significativas con respecto al perfil de aminoácidos.



## 5.1. VIA METABOLICA DE LA HOMOCISTEÍNA

Para la valoración de la **metilación**, se realizó un análisis comparativo entre los pacientes PKU y los controles, cuyos resultados presentamos a continuación.

Se llevó a cabo una determinación de los niveles de aminoácidos plasmáticos metionina y cisteína, así como de la homocisteína plasmática, de los niveles plasmáticos de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> y de ácido metilmalónico en orina. Todo ello aparece presentado en la Tabla 12.

	<i>Media ± DE</i>	<i>Rango (P<sub>3</sub>-P<sub>97</sub>)</i>	<i>Rango de Referencia</i>	<i>% Pacientes con percentiles fuera de rango</i>	
				<i>&lt;P<sub>3</sub></i>	<i>&gt;P<sub>97</sub></i>
Metionina (μmol/L)	22,4 ± 6,3	10,7-35,7	13,8-56	5	-
Homocisteína (μmol/L)	6,3 ± 4,7	2,3-25,7	5-15	48	-
Cisteína (μmol/L)	33,9 ± 7,9	22,2-51	1,7-37,9	-	31,2
Ácido fólico (ng/mL)	21,5 ± 10,4	4,5-50,8	3,4-20	-	56,4
Vitamina B <sub>12</sub> (pg/mL)	696 ± 387	217,8-1.942	220-980	2,6	15,4
MMA orina (μmol/L)	0,26 ± 0,3	0,001-1,65	-	-	-

Tabla 12. Media, desviación estándar y percentiles de los aminoácidos metionina, homocisteína y cisteína, de las vitaminas ácido fólico y B<sub>12</sub> y del MMA en orina.

En los pacientes PKU la vitamina B<sub>12</sub> y el ácido fólico estaban significativamente aumentados con respecto a la población control (entendida como el rango de control de la bioquímica). En los pacientes tratados con BH<sub>4</sub>, los niveles de estas sustancias eran más similares a los del rango de normalidad, de forma estadísticamente significativa en el caso de la B<sub>12</sub> (p=0,01) (Figura 18).

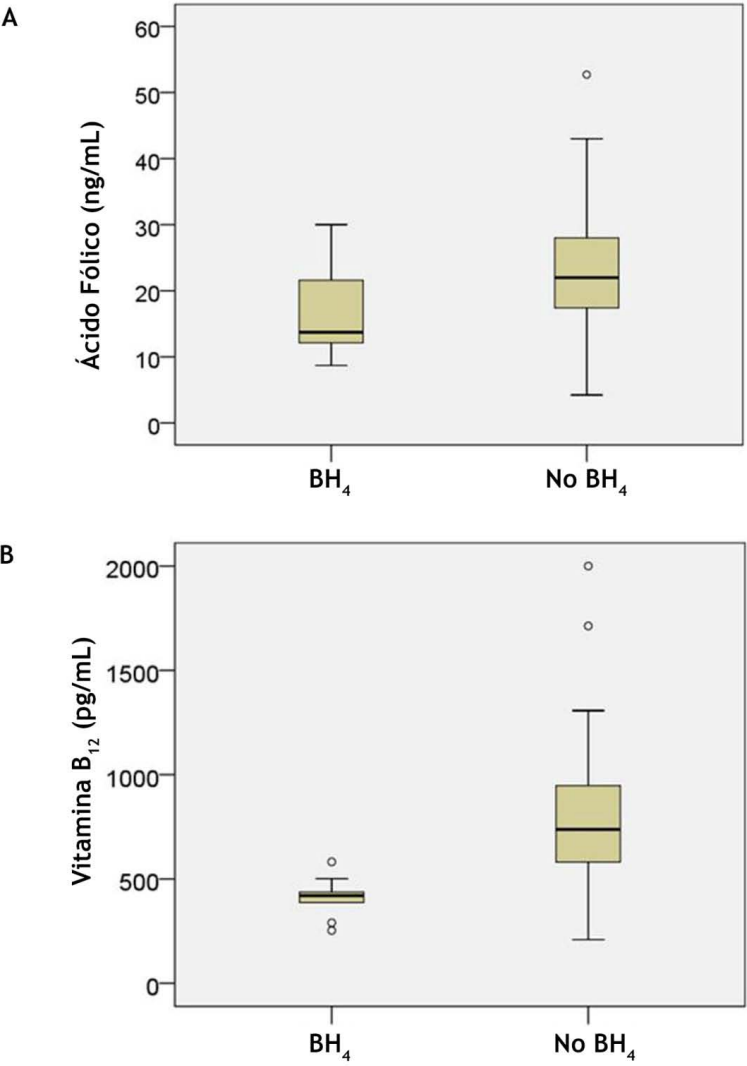


Figura 18. La concentración de ácido fólico (A) y vitamina B<sub>12</sub> (B), es mayor en los pacientes PKU que en los controles, si bien en los pacientes que reciben BH<sub>4</sub> los niveles de estas sustancias son más similares a los de la población control.

## 5.2. RUTAS METABOLICAS RELACIONADAS CON LA METILACIÓN

### 5.2.1. Vía Arg-ADMA-NO

Para la valoración de la vía **Arg-ADMA-NO**, determinamos los valores de ADMA, SDMA y arginina en el plasma de los pacientes PKU. La media y la distribución de estos valores aparecen reflejados en la Tabla 13.

Valores plasmáticos ( $\mu\text{mol/L}$ )	Media $\pm$ DE	Rango ( $P_3$ - $P_{97}$ )	Rango de Referencia	% Pacientes con valores $<P_3$
ADMA	0,35 $\pm$ 0,09	0,18-0,6	0,4-1,11	72,5
SDMA	0,44 $\pm$ 0,09	0,3-0,6	0,37-1,28	30
Arginina	49,89 $\pm$ 18	21,52-91,4	51,2-160,5	42,5

Tabla 13. Valoración de la vía Arg-ADMA-NO.

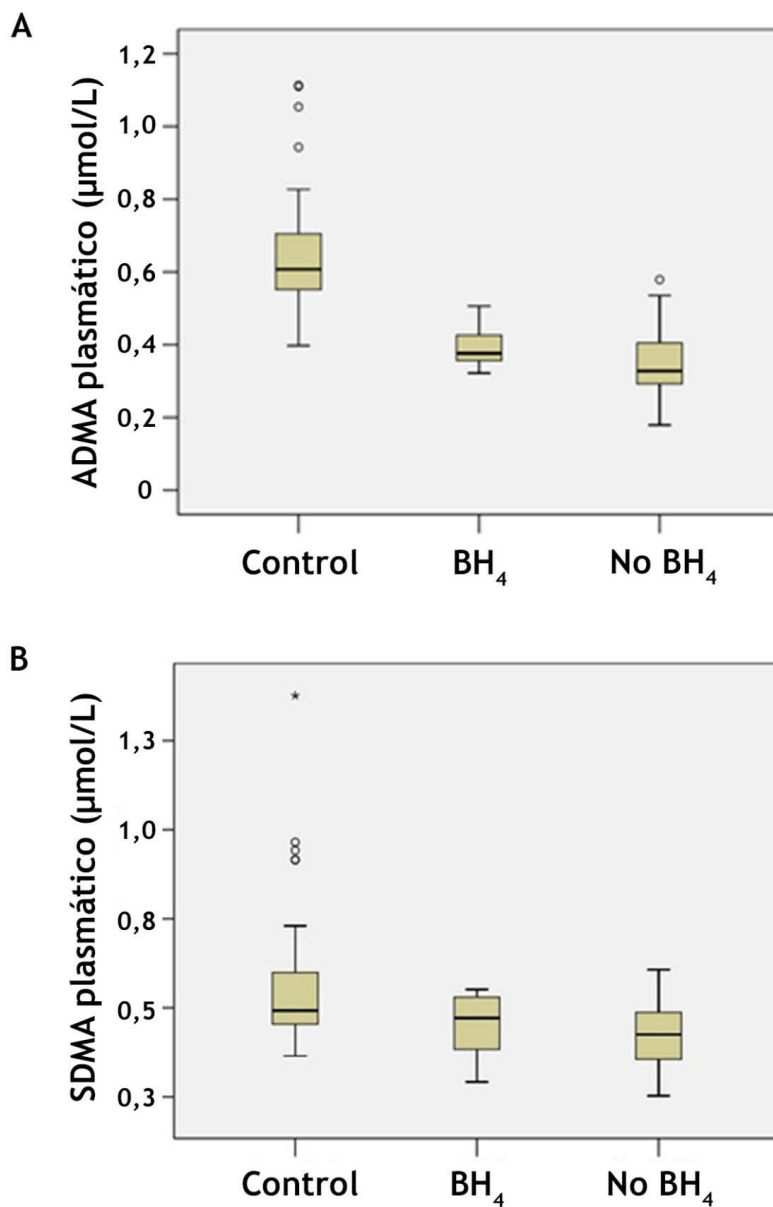
En los pacientes PKU encontramos unos niveles plasmáticos de ADMA, SDMA y arginina, inferiores a los de los controles, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. También encontramos una relación Arg/ADMA mayor en los pacientes PKU con respecto a los controles, si bien esta diferencia no es significativa (Tabla 14).

Valores plasmáticos	Media en el grupo control	Media en el grupo PKU	Significación estadística (p)
ADMA ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,65	0,35 (↓)	<0,001
SDMA ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,57	0,43 (↓)	<0,001
Arg ( $\mu\text{mol/L}$ )	87,7	49,89 (↓)	<0,001
Arg/ADMA	140,6	158,7 (↑)	0,69

Tabla 14. Diferencias en los niveles plasmáticos de ADMA, SDMA y arginina, así como en la relación Arg/ADMA en los pacientes PKU con respecto a los controles.

Cuando estratificamos a los pacientes PKU en función de su tratamiento con  $\text{BH}_4$ , vemos que aquellos que no reciben dicho tratamiento tienen niveles más bajos de ADMA, SDMA y Arg que aquellos que sí lo reciben, aunque esta

diferencia no es significativa ( $p= 0,17 / 0,57 / 0,46$  respectivamente). De la misma manera, la relación Arg/ADMA es mayor en los pacientes PKU que no reciben  $BH_4$ , de forma no significativa ( $p=0,57$ ) (Figura 19).



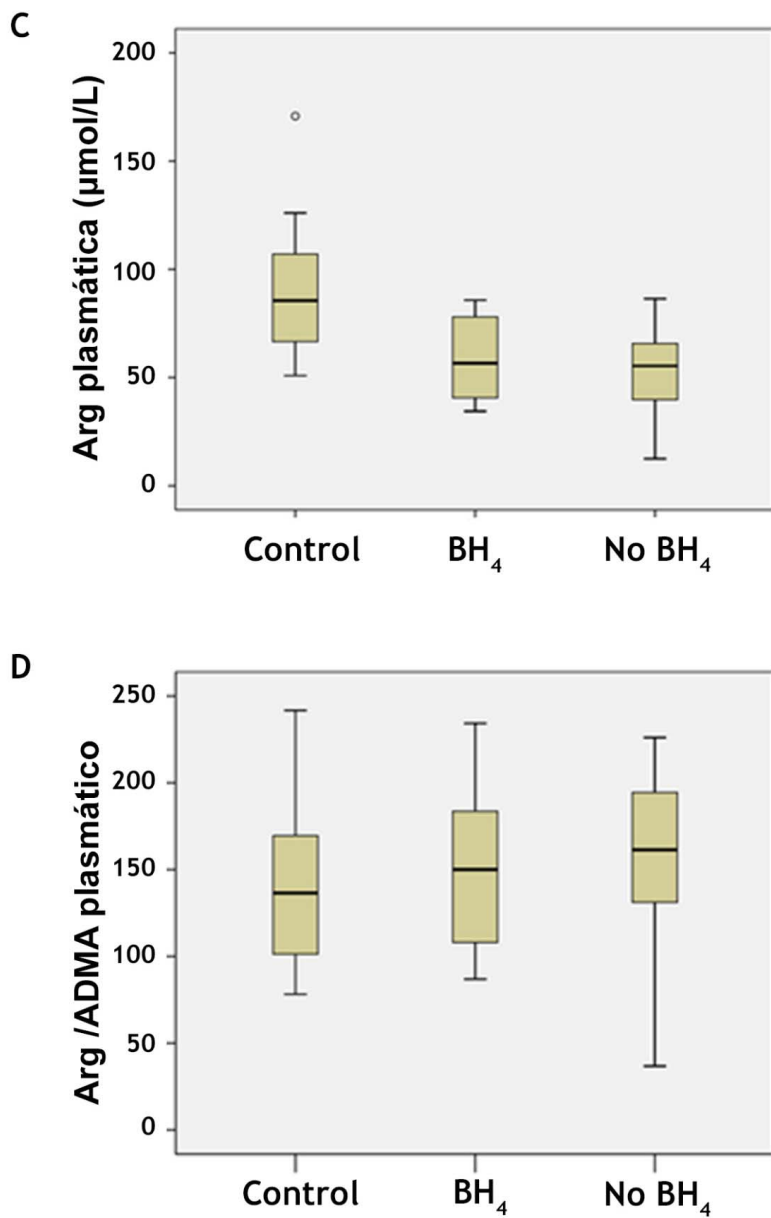


Figura 19. Diferencias entre los niveles de: ADMA (A), SDMA (B), Arg (C) y Arg/ADMA (D) entre los controles y los pacientes PKU, estando éstos estratificados en función de su respuesta a la  $\text{BH}_4$ .

### 5.2.2. Vía Arg-GAA-Creatina

Para la valoración de la ruta **Arg-GAA-Cr**, se hallaron los valores de GAA y creatina en plasma, así como los niveles plasmáticos de arginina y glicina, que aparecen reflejados en la Tabla 15.

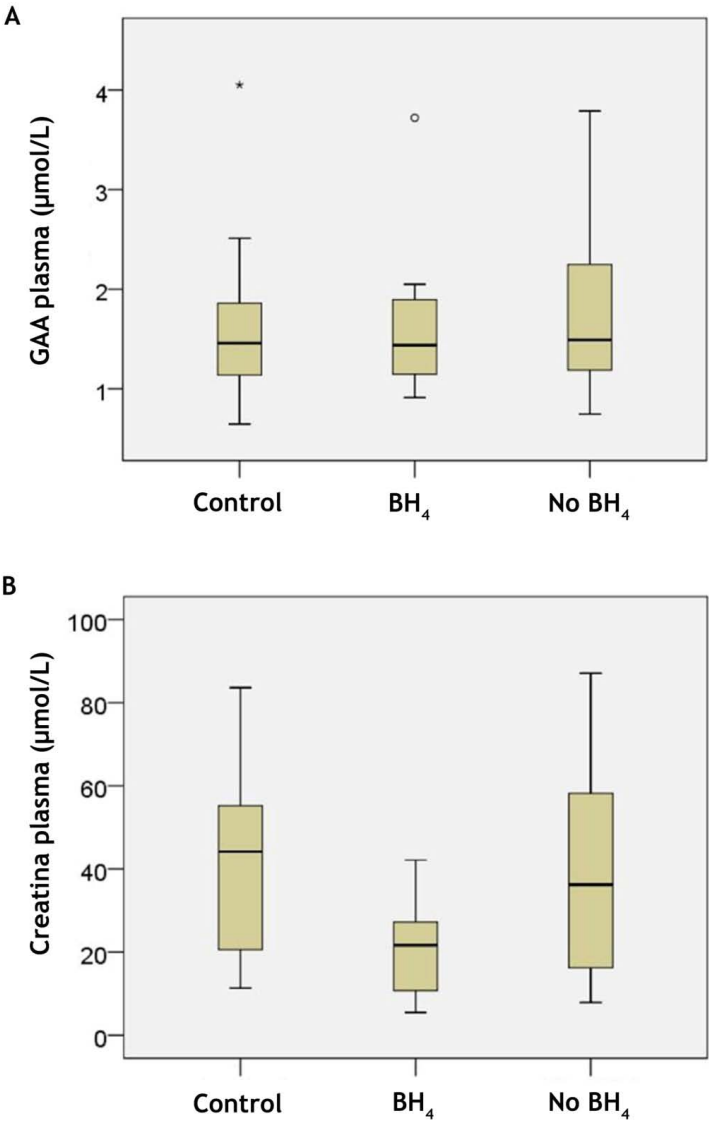
	<i>Media ± DE</i>	<i>Rango (P<sub>3</sub>-P<sub>97</sub>)</i>	<i>Rango de Referencia</i>	<i>% Pacientes con percentiles fuera de rango</i>	
				<i>&lt;P<sub>3</sub></i>	<i>&gt;P<sub>97</sub></i>
GAA plasma (μmol/L)	1,75 ± 0,8	0,78-3,77	0,65-4,05	-	-
Creatina plasma (μmol/L)	34,62 ± 22,3	5,73-84,55	11,34-83,62	14,6	-
Arginina (μmol/L)	49,89 ± 18	21,52-91,4	51,2-160,5	42,5	-
Glicina (μmol/L)	280,83 ± 85	140-528,1	137,5-385	2,4	1,2

Tabla 15. Valoración de la ruta Arg-GAA-Cr.

En los pacientes PKU los niveles de GAA están más elevados y los de creatina plasmática más bajos que en los controles de forma no estadísticamente significativa ( $p= 0,35 / 0,16$  respectivamente), al estratificar la muestra en función de la respuesta a la BH<sub>4</sub>, los valores de creatina en el grupo PKU que toma BH<sub>4</sub> son significativamente inferiores ( $p=0,008$ ). Los niveles de creatinina plasmática están significativamente más bajos en los pacientes PKU que en los controles, de forma estadísticamente significativa (Tabla 16, Figura 20).

	Media del grupo control	Media del grupo PKU	Significación estadística (p)
GAA plasma (μmol/L)	1,58	1,75 (↑)	ns
Creatina plasma (μmol/L)	41,9	34,62 (↓)	ns
Creatinina plasma (mg/dL)	0,65	0,5 (↓)	0,007

Tabla 16. Diferencias entre la GAA, creatina plasmática y creatinina plasmática entre los pacientes PKU y el grupo control. (ns = no significativo)



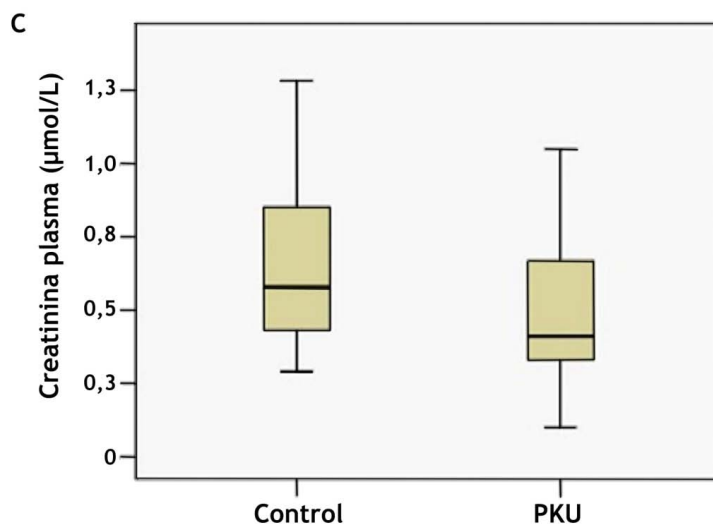


Figura 20. Diferencias entre los niveles de GAA en plasma (A), creatina en plasma (B) y creatinina en plasma (C) entre los grupos control y PKU. Se ha estratificado a los pacientes PKU en función de su respuesta a la BH<sub>4</sub>.

### 5.3. CORRELACIONES

Encontramos una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de los siguientes metabolitos:

- Correlación negativa entre los niveles de homocisteína y los niveles de ADMA (a mayor nivel de homocisteína, y por lo tanto menor metilación, menor nivel de ADMA), como se ve en la Figura 21.
- Correlación positiva entre los niveles de fenilalanina y los niveles de homocisteína (a mayor nivel de fenilalanina, mayor nivel de homocisteína, es decir, mayor ingesta proteica); ver Figura 22.
- Correlación negativa entre los niveles de fenilalanina y los niveles de ADMA (a mayor nivel de fenilalanina, es decir, peor control metabólico, menor nivel de ADMA); ver Figura 23.



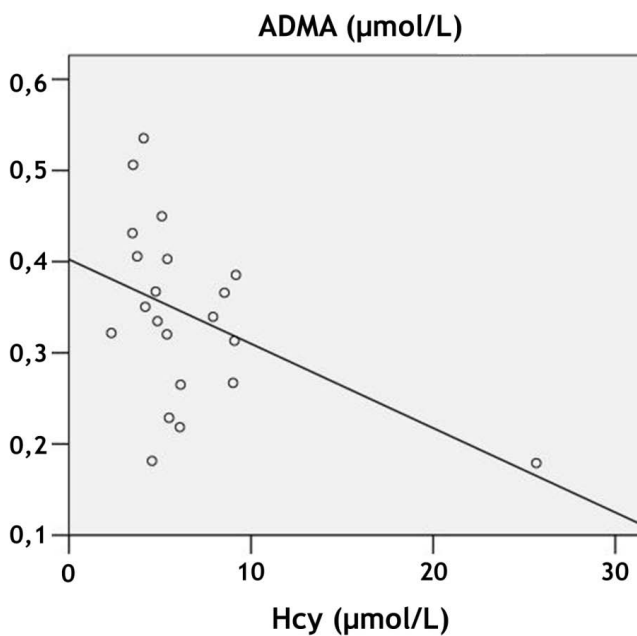


Figura 21. Correlación negativa entre Homocisteína y ADMA.  $R^2 = 0,21$ .  $p = 0,037$

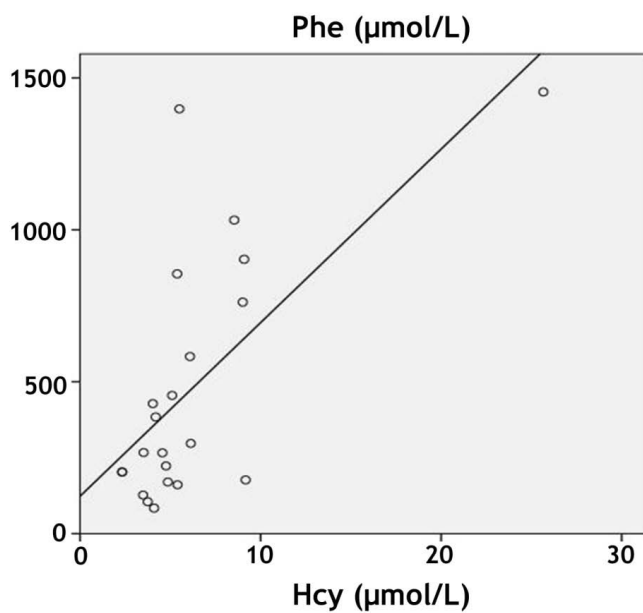


Figura 22. Correlación positiva entre fenilalanina y homocisteína.  $R^2 = 0,44$ .  $p = 0,001$ .

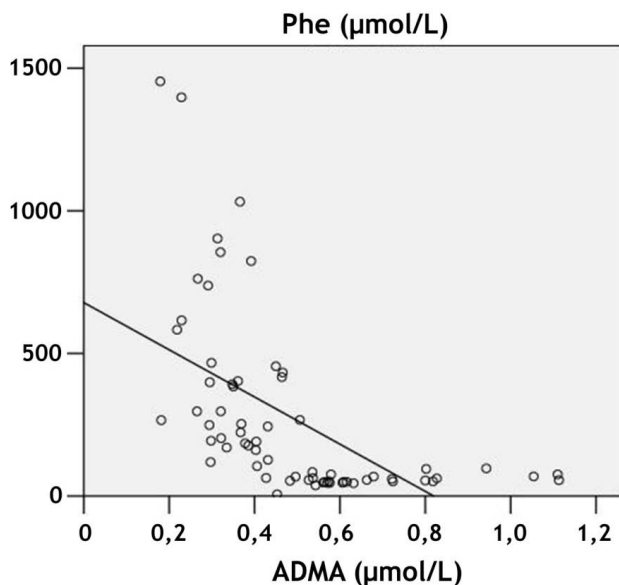


Figura 23. Correlación negativa entre fenilalanina y ADMA.  $R^2= 0,31$ .  $p<0,001$ .

También encontramos una correlación entre las cifras de vitamina B<sub>12</sub> y la función hepática, así, los niveles de B<sub>12</sub> se correlacionan con la cifra de GOT ( $R^2=0,26$ ,  $p=0,001$ ) y con la cifra de GPT ( $R^2=0,2$ ,  $p=0,005$ ) (Figuras 24 y 25).

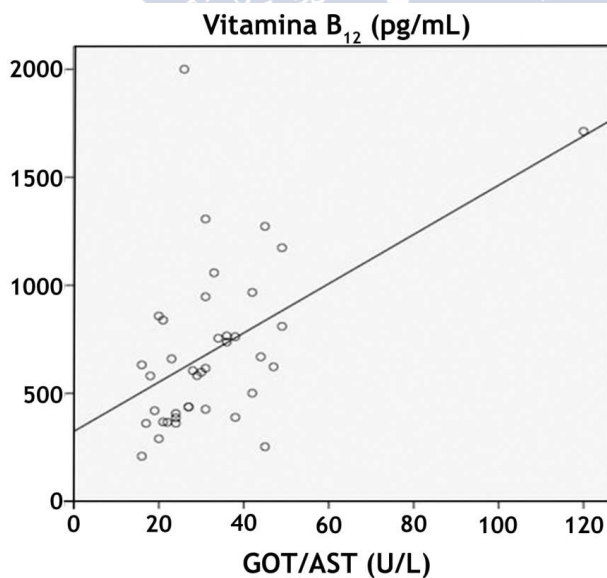


Figura 24. Correlación lineal entre los valores plasmáticos de GOT/AST y los niveles de vitamina B<sub>12</sub>, de forma que a mayor valor de GOT/AST, mayor valor de B<sub>12</sub>.

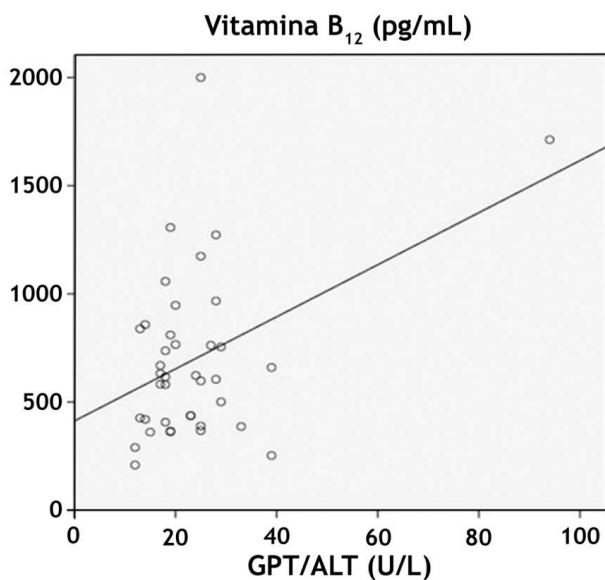


Figura 25. Correlación lineal entre los niveles plasmáticos de GPT/ALT y los de B<sub>12</sub>.

Encontramos varias correlaciones estadísticamente significativas entre la creatinina plasmática y los niveles de vitamina B<sub>12</sub>, homocisteína, fenilalanina, arginina y cisteína. Las correlaciones positivas implican que a mayor nivel de creatinina plasmática mayor nivel del parámetro correlacionado y las correlaciones negativas implican que a mayor nivel de creatinina plasmática menor nivel del parámetro correlacionado (Tabla 17).

Parámetros de laboratorio	Relación con la creatinina plasmática	
	Correlación de Pearson	P
Vitamina B <sub>12</sub> (pg/mL)	-0,35	0,03
Homocisteína (μmol/L)	0,68	<0,001
Fenilalanina (μmol/L)	0,69	<0,001
Arginina (μmol/L)	-0,33	0,048
Cisteína (μmol/L)	0,37	0,024

Tabla 17. Correlación entre la creatinina plasmática y los niveles vitamina B<sub>12</sub>, homocisteína, fenilalanina, arginina y cisteína.

De la misma manera, encontramos una correlación positiva entre los niveles de creatinina plasmática y los valores de ácido úrico, colesterol, y prealbúmina, y negativa entre la creatinina plasmática y la vitamina D y la GOT (Tabla 18).

<b>Parámetros de laboratorio</b>	<b>Correlación con la creatinina plasmática</b>	
	<b>Correlación de Pearson</b>	<b>P</b>
Vitamina D (ng/mL)	-0,39	0,019
Ácido úrico (mg/dL)	0,44	0,007
Colesterol (mg/dL)	0,32	0,048
GOT/AST (U/L)	-0,54	0,001
Prealbúmina (mg/dL)	0,72	0

Tabla 18. Correlaciones entre la creatinina plasmática y distintos parámetros de laboratorio.

Por último, encontramos una correlación positiva entre la cifra de creatinina plasmática y la mediana de Phe en el último año y la Phe de control, y negativa entre la creatinina plasmática y los aportes de proteínas totales y naturales por Kg de peso y día (Tabla 19).

<b>Parámetros de control</b>	<b>Correlación con la creatinina plasmática</b>	
	<b>Correlación de Pearson</b>	<b>P</b>
Aportes proteínas totales (g/Kg/día)	-0,56	0,01
Aportes proteínas naturales (g/Kg/día)	-0,59	0,007
Mediana de Phe en el último año ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,83	<0,001
Phe de control ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,63	<0,001

Tabla 19. Correlación de las cifras de creatinina plasmática con distintos parámetros de control de la PKU.



## **6. DISCUSIÓN**



## 6. DISCUSIÓN

En esta Tesis Doctoral se recogen los datos y estudios realizados sobre el ciclo de la metilación en 84 pacientes, de los cuales 42 son controles y 42 son pacientes fenilcetonúricos seguidos en las Unidades de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela y del Hospital de Cruces. Estas unidades son ambas Centro de referencia a nivel nacional (CSUR) para el diagnóstico y tratamiento de los pacientes con enfermedades metabólicas hereditarias, dentro de las que se encuentra la PKU.

Tras el descubrimiento de la PKU y el inicio del cribado metabólico neonatal universal, se ha podido realizar el diagnóstico precoz de estos pacientes y consecuentemente el tratamiento dietético desde edades muy tempranas, lo que ha permitido evitar el desarrollo de secuelas neurológicas que derivarían en la mayor parte de los casos en retraso mental severo. Con ello, se ha conseguido que estos pacientes lleven una vida prácticamente normal, salvo por las peculiaridades de su dieta; sin embargo han ido apareciendo otros aspectos derivados o bien de la propia enfermedad, o quizá secundarios al tratamiento de la misma, que inciden directamente en la calidad de vida de estos pacientes. Entre ellos queremos destacar las alteraciones de la metilación, que si bien se han ido sospechando en los últimos años a raíz de alteraciones descritas en los metabolitos relacionados, como la homocisteína o el ADMA<sup>87,100</sup> todavía son muy poco conocidas.

### 6.1. ESTUDIO GENÉTICO

La deficiencia de PAH causa un rango de fenotipos PKU basados en los niveles de Phe a su detección previos al tratamiento dietético, y/o en la tolerancia de Phe en la dieta. Los puntos de corte para la clasificación de PKU clásica, moderada y leve pueden variar de unos países a otros, siendo los aceptados en España los establecidos en el protocolo de fenilcetonuria de AECOM<sup>58</sup>, que a su vez coinciden con los de la guía de EEUU<sup>52</sup>, según los cuales la PKU puede

clasificarse en: clásica ( $\text{Phe} \geq 1200 \mu\text{mol/L}$ ), moderada ( $\text{Phe}$  entre 600 y 1200  $\mu\text{mol/L}$ ), leve ( $\text{Phe}$  entre 360 y 600  $\mu\text{mol/L}$ ) y HPA benigna ( $\text{Phe} < 360 \mu\text{mol/L}$ ). El estudio genético también ayuda a establecer el fenotipo.

En un estudio realizado para conocer las mutaciones más prevalentes del gen *PAH* en Galicia<sup>35</sup>, se recogieron datos de 105 pacientes diagnosticados de hiperfenilalaninemia a lo largo de 31 años, de los cuales 39 eran PKU clásicas, 20 formas moderadas, 8 formas leves y 38 HPA benignas. Nuestro trabajo recoge resultados de 42 pacientes tanto de la población PKU de Galicia como del País Vasco, manteniéndose las mismas proporciones en cuanto a la clasificación diagnóstica de la enfermedad (23 formas clásicas, 16 moderadas y 3 leves).

Si bien es cierto que conocemos el resultado funcional en cuanto a actividad enzimática de la PAH que conllevan ciertas mutaciones, y que por tanto en base a ellas podemos predecir el fenotipo de los pacientes PKU, también es cierto que todavía existen factores no conocidos que condicionan el fenotipo real<sup>101</sup>.

La actividad residual relativa de la PAH se calculó conforme a los datos expuestos en las bases de datos de PAHdb y/o BH<sub>4</sub>db, que proporcionan valores calculados de acuerdo con la expresión *in vitro* de proteínas mutantes recombinadas. La actividad de PAH se define como la suma media de actividades de los dos alelos mutados y se expresa como el porcentaje de la forma salvaje de la enzima. De acuerdo con esto, las mutaciones p.E280K, p.R243X, p.R243Q, p.R158Q, p.R252W, IVS12+1G>A, p.S349P, y p.R408W se asocian con una actividad nula o muy baja de PAH; p.R261Q, p.V388M, p.R176L, y p.L348V con una actividad enzimática moderada y p.E390G, p.V230I, p.P244L, y p.P211T con una actividad residual elevada.

Se objetiva en nuestro estudio una buena correlación genotipo-fenotipo, con pacientes portadores de mutaciones nulas que muestran altos niveles de concordancia con los fenotipos más graves como ha sido publicado previamente<sup>102,103</sup>. Las salvedades serían el paciente 12, en el que a pesar de presentar las mutaciones p.R243X y p.R176L, ambas asociadas a una actividad



enzimática muy baja, dan lugar a una forma clínica leve, y el paciente 19 que también es una PKU leve a pesar de la mutación p.R176L.

En el resto, mutaciones asociadas a escasa actividad de PAH y con fenotipo concordante (PKU clásica) son: p.R243Q (paciente 28), p.R158Q (paciente 18), p.R252W (paciente 30), p.S349P (paciente 2) y p.E280K (pacientes 8 y 9), p.R243X (pacientes 4, 5, 7 y 10) y IVS12+1G>A (paciente 42). Las mutaciones asociadas con un déficit moderado de la actividad enzimática y con concordancia genotipo-fenotipo (PKU moderada) son: p.R261Q (paciente 23) y p.V388M (pacientes 21, 22, 32, 40).

De la misma manera, podríamos ser capaces de prever la respuesta a la BH<sub>4</sub> en función del genotipo, ya que existen mutaciones que se asocian a una mayor incidencia de respuesta al tratamiento con sapropterina<sup>104,105</sup>. Así, de los pacientes respondedores, presentan una mutación que previsiblemente se asocia a respuesta a la BH<sub>4</sub> el 1 y el 37 (p.R68S), el 21 y el 32 (p.V388M), el 23 (p.R261Q) y el 31 (p.I65T).

Entre los pacientes de Galicia, la mutación más frecuentemente encontrada es la c.1066-11G>A o también conocida como IVS10nt-11G>A (8/19), considerada como la principal mutación mediterránea<sup>106-108</sup> y asociada a un fenotipo clásico, como ya habían señalado Couce *et al*<sup>35</sup>. Entre los pacientes del País Vasco, las mutaciones más frecuentemente encontradas son la p.V388M (7/23) y la p.I65T (6/23) (asociadas a un fenotipo moderado).

## 6.2. NUTRICIÓN Y DESARROLLO

El crecimiento y desarrollo de los pacientes PKU es un tema de preocupación en cuanto a su seguimiento, ya que el tratamiento nutricional al que se someten, con un escaso aporte de proteínas naturales, puede conllevar un estado de malnutrición y retraso de crecimiento. Esto se debe a que existe una importante limitación tanto en la administración de las fuentes naturales de algunas vitaminas y minerales (vitaminas del grupo B, ácido fólico, zinc, selenio,

hierro, entre otros) como en su biodisponibilidad, y esta limitación es tanto más importante cuanto más estricto es el tratamiento dietético<sup>68</sup>.

Los ensayos clínicos existentes arrojan resultados contradictorios, ya que mientras algunos muestran que la nutrición, el crecimiento y el desarrollo físico de los pacientes PKU es inferior al de individuos sanos<sup>67,68,109-112</sup>, otros por el contrario afirman que un crecimiento y desarrollo adecuados son posibles cuando se realiza un correcto tratamiento dietético, ya sea con con BH<sub>4</sub> o sin ella<sup>69,113-117</sup>.

Un estudio reciente llevado a cabo en nuestro país para evaluar el desarrollo pondoestatural de los pacientes PKU, valoró el desarrollo de una cohorte de pacientes con PKU y HPA desde los 6 meses hasta los 18 años, encontrándose una correlación positiva entre la tolerancia de Phe de la dieta y el peso y la talla de los pacientes, de tal manera que mientras que aquellos que presentaban una HPAB apenas tenían alteraciones en cuanto a los parámetros antropométricos, en los pacientes PKU destacaban dos períodos de mayor afectación para el crecimiento y desarrollo, que eran la primera infancia y la edad adulta, alcanzando estos niños una talla final inferior al p<sub>50</sub><sup>68</sup>.

En nuestra muestra, se incluyen pacientes de un amplio rango de edades (6 meses a 43 años), así como pacientes respondedores/no respondedores a BH<sub>4</sub>, y por tanto, pacientes con unas características nutricionales bastante variadas en cuanto a tolerancia de Phe en la dieta, aunque en general con un buen control dietético en la mayoría de ellos.

Cuando analizamos lo que ocurre con el IMC en el total de la muestra, nos encontramos con que el 51,2% de los pacientes presentan un peso normal y 17 pacientes (41,5%) presentan sobrepeso, de acuerdo con la definición de la OMS<sup>95,96</sup>. En la literatura se refiere cómo los pacientes PKU presentan una tendencia a ganar peso a medida que la edad aumenta<sup>118-121</sup>, existiendo un rebote del IMC a partir de los 6 años<sup>68</sup>. Una de las teorías que se postulan para explicar este fenómeno es que los suplementos exentos en Phe son ricos en carbohidratos y proporcionan un alto aporte calórico<sup>122</sup>; por otra parte la carga social que

implica el seguimiento de este tipo de dietas hace que los pacientes rechacen la actividad física.

En cuanto a la talla, al considerar los Z-score, y por tanto comparar los datos de nuestros pacientes con la población de referencia, encontramos que presentan una puntuación inferior a 0 (-0.8), si bien es cierto que los pacientes de nuestra muestra se encuentran en distintos estadios de desarrollo y que por lo tanto no podemos tener una conclusión definitiva acerca de su talla final (14 pacientes son mayores de 16 años, el resto, se encuentran por debajo de esa edad).

De forma general, se estima que los pacientes con PKU clásica tienen una tolerancia de Phe <350 mg/día, las PKU moderadas tienen una tolerancia 350-400 mg/día y las leves de 400-600 mg/día<sup>28</sup>. Si bien en nuestra muestra las formas más frecuentes son la clásica y la moderada, la tolerancia media de Phe es de 651 mg/día, es decir, bastante elevada con respecto a lo esperable por su fenotipo. La tolerancia de Phe es mucho mayor en los pacientes tratados con BH<sub>4</sub>, alcanzando una media de 882 mg/día. De la misma manera, la ingesta de proteínas totales en los pacientes PKU, de forma global, es de  $1 \pm 0,5$  g/kg/día, de las cuales las proteínas naturales suponen algo más de la mitad ( $0,6 \pm 0,5$  g/kg/día), mientras que en los pacientes tratados con BH<sub>4</sub> las proteínas naturales suponen tres cuartas partes de las totales ( $0,8 \pm 0,4$  g/kg/día).

El control dietético de los pacientes se establece de acuerdo a la mediana de Phe en el último año<sup>58</sup>; cuando consideramos este parámetro para cada grupo de edad, vemos cómo en los pacientes hasta los 10 años hay un buen cumplimiento dietético, con independencia del tratamiento con BH<sub>4</sub> (y por tanto de una mayor libertad dietética), siendo los pacientes mayores de 10 años y no tratados con BH<sub>4</sub> los que tienen peor adherencia a la dieta (7 de 15 pacientes, es decir el 47%, tienen mala adherencia). Este dato a su vez confirma algo bien conocido en los pacientes PKU, que es la disminución en la adherencia al tratamiento a medida que los pacientes van creciendo<sup>66,67</sup>.

Ante el riesgo teórico que hemos comentado anteriormente de que los pacientes PKU desarrollen un déficit de vitaminas y minerales, la práctica

habitual es añadir estos micronutrientes a las fórmulas de aminoácidos libres de Phe que se emplean para su tratamiento dietético. Siguiendo con esta línea de pensamiento, los pacientes tratados con BH<sub>4</sub> o aquellos que tengan un peor cumplimiento dietético podrían considerarse de riesgo para desarrollar estas deficiencias nutricionales, al recibir poca cantidad de fórmula exenta de Phe y enriquecida en vitaminas y minerales, mientras que los pacientes con un cumplimiento dietético estricto podrían estar en riesgo de recibir aportes excesivos de suplementos<sup>54,123-125</sup>. Sin embargo, los datos reales sobre el impacto que estos suplementos tienen en el equilibrio nutricional de los pacientes PKU son escasos<sup>126,127</sup>, y el perfil idóneo de micronutrientes para evitar alteraciones en la biodisponibilidad de otras sustancias todavía no ha sido establecido de forma definitiva<sup>128</sup>.

Recientemente, Crujeiras *et al*<sup>129</sup> llevaron a cabo un estudio multicéntrico transversal valorando el estado nutricional de 156 pacientes PKU, para lo cual consideraron la mediana de Phe en el último año, la tolerancia de Phe, parámetros antropométricos y bioquímicos, entre ellos, la determinación de proteínas totales, prealbúmina, electrolitos, selenio, zinc, ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub>, ferritina y vitamina D. En sus resultados, destacan unos niveles de proteínas totales, calcio, fósforo, vitamina B<sub>12</sub> y zinc en rango normal para casi todos los pacientes, unos niveles bajos de prealbúmina, vitamina D y selenio, y, sorprendentemente, unos niveles elevados de ácido fólico. El adecuado control y cumplimiento dietético de los pacientes analizados fue comprobado por los autores.

En nuestra serie, que incluye varios de los pacientes analizados en dicho ensayo previo, un porcentaje importante de pacientes presentaba valores por debajo del rango de normalidad en cuanto a las determinaciones de prealbúmina, 25-OH-VitaminaD y selenio. Especialmente importante es el caso de la prealbúmina, con un 60,7% de pacientes de la muestra PKU con cifras inferiores a 21 mg/dL y del selenio, con un 35% de pacientes con cifras inferiores a 60 µg/L.

Como ya hemos comentado, nuestros pacientes corresponden fundamentalmente a formas de PKU clásicas y moderadas, en las que además hemos objetivado un adecuado control dietético en base a la mediana de Phe y a los datos obtenidos a partir de la encuesta dietética de estos pacientes (tolerancia de Phe, ingesta de proteínas totales y naturales). Por otra parte, los niveles de prealbúmina constituyen uno de los marcadores más fiables de malnutrición o de escaso desarrollo, de tal manera que niveles inferiores a 20-21 mg/dL son predictores de escaso crecimiento<sup>76,130</sup>. Por lo tanto, y aunque no podamos señalar una asociación estadísticamente significativa, sí podemos establecer una relación entre el fenotipo de PKU, la restricción dietética/adhesión al tratamiento y el escaso desarrollo estatural (puesto de manifiesto en el Z-score de talla).

Con respecto al selenio, desde hace algunos años se suplementan las fórmulas exentas en Phe diseñadas para el tratamiento de la PKU con este mineral, por su posible papel en el control del estrés oxidativo asociado a esta enfermedad. La cantidad de selenio que aportan las fórmulas varía de unas casas comerciales a otras, y además, la absorción intestinal de selenio depende de la ingesta de proteínas animales. Estudios recientes han puesto de manifiesto que a pesar de esta suplementación, los niveles de selenio en los pacientes PKU se encuentran bajos, mejorando en aquellos que llevan una dieta más libre en cuanto a consumo de proteínas naturales<sup>115,129</sup>.

En el caso de la 25-OH-VitaminaD, un 13,5% de los pacientes presentan cifras inferiores a 20 ng/mL (insuficiencia moderada), si bien es cierto que la producción de esta vitamina depende de múltiples factores, siendo el más importante la exposición solar, que varía según la latitud, de forma que el déficit de vitamina D es más frecuente en la zona Norte de España, que en la zona Sur<sup>129</sup>. Por otra parte, aunque la vitamina D está implicada en el desarrollo óseo, y éste se encuentra alterado en los pacientes PKU, Mirás *et al*<sup>73</sup> no encontraron una relación entre los niveles de vitamina D y la pérdida de masa ósea de los pacientes PKU, relación que sí existía con la ingesta proteica (a mayor restricción proteica, menor masa ósea).

Las concentraciones elevadas de Phe en sangre inhiben la síntesis de colesterol en modelos animales, y existen estudios que refieren cifras bajas de colesterol sérico en relación con cifras elevadas de Phe, lo que podría estar implicado con alteraciones en la mielinización<sup>131-134</sup>. En nuestra muestra, si bien la mayoría de los pacientes presentan niveles adecuados de colesterol total, cuando se analiza el colesterol fraccionado, hasta un 60% de los pacientes tiene cifras de LDL-colesterol inferiores a 39 mg/dL, y hasta un 13% de los pacientes presenta un HDL-colesterol inferior a 30 mg/dL.

Con respecto al ácido fólico y a la vitamina B<sub>12</sub>, hablaremos de ellos detenidamente más adelante, pero queremos ya señalar que en nuestra muestra encontramos concentraciones elevadas de ambos, siendo los valores medios de ácido fólico de  $21,5 \pm 10,4$  ng/mL (rango de referencia 3,4-17,5 ng/mL) y de la vitamina B<sub>12</sub> de  $696 \pm 387$  pg/mL (rango de referencia 220-980 pg/mL).

Cuando estratificamos la muestra PKU en función del tratamiento con BH<sub>4</sub>, no encontramos diferencias estadísticamente significativas con respecto a los niveles de prealbúmina, selenio, vitamina D ni colesterol fraccionado. Posiblemente esto se deba a que el número de pacientes a tratamiento con BH<sub>4</sub> es pequeño como para poder encontrar tales diferencias.

### 6.3. METILACIÓN

Además de las alteraciones bioquímicas reflejadas, en la literatura existen referencias a otras, que cuando se ponen en conjunto, lo que indican es que en estos pacientes existe una alteración del metabolismo de la arginina, que tiene su origen en la vía de la metilación. Así, se han descrito niveles elevados de homocisteína<sup>77</sup> y MMA en orina (que se comporta como un marcador del déficit funcional de vitamina B<sub>12</sub>)<sup>100</sup>, un incremento del estrés oxidativo, que unido a la menor disponibilidad proteica de los pacientes PKU sometidos a un tratamiento dietético estricto supone una mayor velocidad de oxidación de los aminoácidos postprandiales, y por tanto a menores niveles de prealbúmina<sup>135,136</sup>, y finalmente, niveles de plasmáticos bajos de ADMA<sup>87</sup>.

Aunque la afectación teórica de la vía de la metilación resulta muy evidente, la explicación de las alteraciones bioquímicas que de ella se derivan y que podemos encontrar en los pacientes PKU es compleja, y ha requerido de varios ensayos clínicos<sup>77,87,88,90</sup> para tratar de descifrar las interrelaciones entre la situación metabólica condicionada por la propia patología y las consecuencias derivadas de la intervención dietética sobre la misma, sin que ésta todavía esté claramente definida.

En un primer momento, Schulpis *et al*<sup>77</sup> detectaron unos niveles bajos de vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y ácido fólico en los pacientes PKU que llevaban una dieta estricta. Este déficit de cobalamina y folato conlleva una alteración en la vía de la remetilación, y por tanto, una elevación moderada de la homocisteína en plasma, que también hallaron en su muestra. Dado que tanto los pacientes PKU como los pacientes con homocistinuria presentan un riesgo cardiovascular elevado, ellos concluyeron que el riesgo cardiovascular en los pacientes PKU se debía a una elevación de la homocisteína plasmática. Por otra parte, a raíz de estos resultados, los suplementos nutricionales de los pacientes PKU se enriquecieron con vitaminas del grupo B y ácido fólico.

Posteriormente, Kanzelmeyer *et al*<sup>87</sup> llevaron a cabo un estudio para determinar el papel del ADMA en el riesgo cardiovascular de los pacientes con homocistinuria y PKU. A diferencia de lo que esperaban encontrar, vieron que en los pacientes PKU la concentración de ADMA era significativamente menor que en los controles y que la relación L-arginina/ADMA era similar en los pacientes con fenilcetonuria y en el grupo control, por lo que concluyeron que no les parecía que estuviera alterada dicha vía.

Siguiendo la misma línea de pensamiento, Huemer *et al*<sup>88</sup>, basándose en el hecho de que en la fenilcetonuria el metabolismo proteico está alterado y el estrés oxidativo es elevado, lanzan la hipótesis de que los niveles de ADMA podrían estar elevados en dichos pacientes. Sin embargo, de la misma manera que Kanzelmeyer<sup>87</sup>, encontraron unos niveles de ADMA más bajos que en el grupo control. Además, la relación L-arginina/ADMA estaba significativamente más

elevada. No encontraron correlación entre ADMA y la ingesta de proteína natural diaria ni la cantidad de suplementos de aminoácidos.

Los mismos resultados fueron obtenidos por Sanamaya *et al*<sup>90</sup> que también buscaron una correlación con los valores de fenilalanina en sangre, sin hallarla.

En definitiva, si bien es cierto que los pacientes PKU que siguen un tratamiento dietético estricto presentan un riesgo potencial de desarrollar un déficit de vitaminas del grupo B y de ácido fólico, y que esto a su vez generaría un aumento de la homocisteína, la restricción proteica y los aportes vitamínicos de los suplementos que reciben estos pacientes conllevan la situación contraria<sup>129</sup>.

Así, nuestra hipótesis es que este aumento de fólico y B<sub>12</sub> favorecería la remetilación de homocisteína a metionina. Además, como existe un incremento de la trans-sulfuración, ello supondría un aumento de la cisteína, y ambas situaciones darían lugar a una menor disponibilidad de grupos metilo para las vías metabólicas relacionadas con la metilación. Así, por un lado, la producción de ADMA se vería alterada, dando como resultado menores niveles del mismo, y por otro lado, en la vía de la creatina, se produciría una menor metilación del GAA.

Todas estas alteraciones sospechadas tendrían su traducción en el perfil de aminoácidos, como finalmente comprobamos en nuestros pacientes PKU, al comparar su perfil de aminoácidos con el de la población control. Además de la elevación lógica de Phe que esperaríamos encontrar, vemos una disminución de los niveles de Met (22,4 vs 24,7  $\mu\text{mol/L}$ ), Arg (49,9 vs 89,5  $\mu\text{mol/L}$ ) y Citr (29,6 vs 31,6  $\mu\text{mol/L}$ ), consecuencia del aumento de la remetilación y un aumento de la Cys (33,9 vs 17,21  $\mu\text{mol/L}$ ), como consecuencia del aumento de la trans-sulfuración, así como un aumento de aquellos aminoácidos que dependen de la Arg para su metabolismo, como son la Gly (280,8 vs 217,6  $\mu\text{mol/L}$ ) y la Orn (61,3 vs 46,5  $\mu\text{mol/L}$ ). Estas alteraciones, salvo en el caso de la Met y Citr, son estadísticamente significativas.



Para confirmar nuestra hipótesis, se llevó también a cabo una determinación de los niveles de ácido fólico y de vitamina B<sub>12</sub>, que se encontraban considerablemente elevados con respecto a los rangos de referencia como ya hemos reflejado. Así, los valores medios de ácido fólico fueron de  $21,5 \pm 10,4$  ng/mL, siendo el rango de referencia 3,4-17,5 ng/mL y en el caso de la vitamina B<sub>12</sub>, los valores medios fueron de  $696 \pm 387$  pg/mL, siendo el rango de laboratorio de 220-980 pg/mL; estos resultados son concordantes con los de otros ensayos previos<sup>115,125,129</sup>. Cuando estratificamos a los pacientes según el tratamiento con BH<sub>4</sub>, vemos cómo en los pacientes respondedores al diclorhidrato de sapropterina los valores de ambos micronutrientes se acercan más al rango de referencia, es decir, a la normalidad, de forma estadísticamente significativa en el caso de la B<sub>12</sub>, hallazgos también compatibles con los de otros autores<sup>129</sup>. En cualquier caso, en ningún grupo encontramos déficit de ninguno de los dos elementos.

Otro de los metabolitos estudiados fue la homocisteína; si bien la media de las determinaciones plasmáticas ( $6,3 \pm 4,7$  µmol/L) se encuentra bastante próxima al rango de referencia (5-15 µmol/L), encontramos un 48% de los pacientes que presentan unos valores inferiores a 2,3 µmol/L (p<sub>3</sub>), por lo tanto, cerca de la mitad de los pacientes de la muestra tiene unos valores de homocisteína plasmática considerablemente bajos.

La homocisteína se origina a partir de la metionina, que es un aminoácido esencial que proviene de las proteínas cuyo metabolismo se lleva a cabo a través de la vía de la trans-sulfuración y la vía de la remetilación.

Por la trans-sulfuración, la metionina se convierte en S-adenosilmetionina, que actúa como dador de grupos metilo en multitud de reacciones de transmetilación. Estas reacciones van a dar lugar a la producción de S-adenosilhomocisteína, la cual se metaboliza en adenosina y homocisteína. La homocisteína a su vez se transforma en cistationina y ésta en cisteína, que finalmente se cataboliza eliminándose por la orina en forma de sulfato.

Por la remetilación, la homocisteína vuelve a transformarse en metionina por dos vías. En la más importante, la reacción de remetilación requiere de metilcobalamina como coenzima y utiliza el metiltetrahidrofolato como sustrato. La otra vía de remetilación es catalizada por la betaína:homocisteína metiltransferasa.

El metabolismo de la homocisteína se halla estrechamente regulado por la ingesta de aminoácidos sulfurados. Cuando existe un exceso de metionina debido a una elevada ingesta proteica, la homocisteína es catabolizada por la vía de la trans-sulfuración, transformándose en cisteína y eliminándose por la orina. Si la ingesta de metionina es baja, la homocisteína se remetila, formándose metionina y SAM<sup>78</sup>.

De esta manera, y según nuestra hipótesis, en la PKU se activarían las dos vías metabólicas de la homocisteína. Por un lado, los niveles elevados de Phe mantendrían activada la trans-sulfuración, consumiendo metionina y homocisteína y produciendo SAM. Pero por otro lado, la restricción de proteínas naturales y los niveles elevados de fólico y B<sub>12</sub> que aportan los suplementos, activarían la remetilación, de forma que los grupos metilos se consumirían mayoritariamente en este proceso, dejando de estar disponibles para otras vías. Al constatar los bajos niveles de metionina y homocisteína de nuestros pacientes, así como la elevación de fólico y B<sub>12</sub>, esta hipótesis cobra valor.

Los grupos metilo del donador SAM se utilizan, entre otras muchas reacciones, para la metilación de residuos de L-arginina; la proteólisis de proteínas con residuos L-arginina metilados da lugar a la producción de tres tipos de compuestos: ADMA, SDMA y L-NMMA<sup>82-84</sup>.

A partir de la L-arginina y por medio de la acción de un grupo de enzimas denominado óxido nítrico sintetasa se produce el NO. El ADMA actúa como inhibidor competitivo de la NOS<sup>137</sup>.

Dado que consideramos que los grupos metilo se consumen en la remetilación de la metionina, la producción de ADMA y SDMA en los pacientes PKU debería estar disminuida, lo que corroboramos al encontrar unos niveles

bajos de estos metabolitos de forma estadísticamente significativa. Por otra parte, la relación Arg/ADMA era mayor en los pacientes PKU que en los controles, si bien esta diferencia no es estadísticamente significativa. Estos resultados son concordantes con los encontrados por Huemer y Sanamaya *et al*<sup>88,90</sup>.

En los pacientes tratados con BH<sub>4</sub>, por un lado, tenemos mayor ingesta de proteínas naturales, y por otro, menor ingesta de suplementos y por tanto de B<sub>12</sub> y fólico, que ya hemos señalado que se encuentran en cifras normales. Por tanto, lo esperable según nuestra hipótesis sería una menor activación de la vía de la remetilación, y por tanto, una mayor disponibilidad de grupos metilo para la producción de ADMA y SDMA.

Lo que comprobamos en nuestros pacientes es que, efectivamente, los que reciben tratamiento con BH<sub>4</sub> tienen niveles mayores de ADMA y SDMA, así como una relación Arg/ADMA menor. Estas diferencias no son estadísticamente significativas, posiblemente como consecuencia del tamaño muestral.

El ADMA y el SDMA se han utilizado como biomarcadores en el caso de pacientes transplantados renales y con enfermedad renal crónica<sup>138-140</sup>. En los pacientes adolescentes y adultos afectados de PKU se ha descrito una alta prevalencia de proteinuria, disminución de la tasa de filtración glomerular, hipercalcemia e hipertensión arterial<sup>72</sup>, si bien ésta última parece principalmente relacionada con la obesidad. Sin embargo, en base a lo que anteriormente hemos señalado, no podemos considerar que en el caso de la PKU exista una relación entre los niveles de estas sustancias y el desarrollo de las alteraciones renales, ya que ambos metabolitos se encuentran disminuidos.

Algunos autores consideran que estas alteraciones podrían deberse a la ingesta de elevadas cantidades de aminoácidos sintéticos, al aumento del estrés oxidativo y al daño local a través de la alta excreción de derivados de fenilalanina. La ingesta de aminoácidos sintéticos provoca un pico de la concentración de aminoácidos en el plasma poco después de su ingesta, lo que conlleva una elevada carga ácida renal, mientras que tras la ingesta de proteína natural las concentraciones plasmáticas de aminoácidos permanecen estables. De

esta manera, la proteína de la dieta es un modulador bien conocido de la función renal<sup>72</sup>.

Otra de las vías que consideramos que podría verse afectada por la menor disponibilidad de grupos metilo es la Arg-GAA-Cr.

En el riñón, la Arg cede su grupo amidino a la glicina para dar lugar a GAA. Posteriormente, en el hígado, se produce la metilación de GAA que da lugar a Cr, la cual es liberada para su captación por los tejidos. La donación del grupo metilo se produce gracias a la transformación de SAM en S-adenosilhomocisteína.

La metilación del GAA para producir creatina consume más grupos metilos que el resto de reacciones de metilación juntas; por este motivo, en condiciones normales, la síntesis de creatina regula la disponibilidad de grupos metilo para el resto de reacciones, como pueda ser la formación de metionina a partir de homocisteína<sup>94</sup>. Sin embargo, nuestra hipótesis es que en la PKU, la producción de creatina estaría limitada por la disminución de grupos metilo, de tal manera que la GAA no metilada, aumentaría en plasma, mientras que los valores plasmáticos de creatina disminuirían.

Así, vemos cómo nuestros pacientes presentan unos valores de GAA aumentados (1,75 vs 1,58  $\mu\text{mol/L}$ ) y unos valores de Cr disminuidos (34,6 vs 41,9  $\mu\text{mol/L}$ ), aunque de forma no estadísticamente significativa. Los niveles plasmáticos del metabolito de la Cr, la creatinina, sí están significativamente bajos (0,5 vs 0,65 mg/dL). En los pacientes tratados con BH<sub>4</sub>, los valores de creatina son significativamente inferiores, en contra de lo que podríamos esperar de acuerdo con nuestra hipótesis; dado el número de pacientes que reciben este tratamiento en nuestra muestra, no podemos saber si este resultado se trata de un epifenómeno, o puede ser justificado desde un punto de vista metabólico. No hemos hallado en la literatura referencias previas a estas alteraciones en los pacientes PKU.

#### 6.4. MARCADORES DE CUMPLIMIENTO DIETÉTICO/SEVERIDAD

Otra evidencia de la alteración de la vía de la metilación en la PKU son las correlaciones que pudimos establecer entre los niveles de Phe, homocisteína y ADMA, que por otra parte nos ponen de manifiesto el valor de la determinación de homocisteína y de ADMA para el seguimiento del cumplimiento dietético por parte de los pacientes.

Para el seguimiento de los pacientes afectos de PKU deben realizarse medidas periódicas de los niveles de Phe en sangre, cuya frecuencia varía en función de la edad de los pacientes. La AECOM establece que en los menores de 6 meses se lleve a cabo una determinación semanal, entre los 6 y los 24 meses quincenal, y mensual en pacientes mayores de 24 meses; la mediana de Phe en el último año se utiliza como variable adicional de control metabólico, que refleja de forma indirecta el cumplimiento dietético. Se consideran adecuados unos valores de mediana de Phe en sangre en niños menores de 6 años  $<360 \mu\text{mol/L}$ , entre 6 y 10 años  $<480 \mu\text{mol/L}$  y  $\leq 600 \mu\text{mol/L}$  en los mayores de esa edad<sup>58</sup>.

De acuerdo con nuestros resultados, y dadas las alteraciones en la vía de la metilación postuladas y comprobadas en nuestro estudio, encontramos en algunos metabolitos un valor potencial como marcadores añadidos del cumplimiento dietético de los pacientes.

Por un lado, encontramos una correlación positiva entre los niveles de Phe y los de homocisteína (a mayor Phe mayor Hcy). Si los niveles de Phe están altos es porque el paciente no estaría realizando un adecuado cumplimiento dietético, y al consumir más proteína natural de la que debe, la Phe, aminoácido azufrado, aumentaría los niveles de Hcy y se pondría en marcha la trans-sulfuración.

Eso nos lleva a la siguiente correlación, negativa, entre los niveles de homocisteína y los niveles de ADMA (a mayor nivel de homocisteína, menor nivel de ADMA). Si ese paciente con mal cumplimiento dietético consume suplementos proteicos enriquecidos en fólico y B<sub>12</sub>, además de la trans-

sulfuración, se pondría en marcha la remetilación, y por tanto, el consumo de grupos metilo conduciría a un descenso del ADMA.

Finalmente, la correlación negativa entre los niveles de Phe y los de ADMA (a mayor nivel de Phe, menor nivel de ADMA) viene a corroborar las dos anteriores; a peor cumplimiento dietético, menores niveles de ADMA plasmáticos.

La correlación positiva entre las cifras de vitamina B<sub>12</sub> y la GOT ( $R^2=0,26$ ,  $p=0,001$ ) y GPT ( $R^2=0,2$ ,  $p=0,005$ ) refuerza nuestra hipótesis y nos permite extrapolar la función hepática como marcador de la adhesión a la dieta. Aquellos pacientes que reciben más cantidad de suplementos (adhesión a la dieta), tendrán mayores cifras de enzimas hepáticas, ya que estos suplementos exigen del metabolismo hepático y al mismo tiempo, si reciben más suplemento, los niveles de B<sub>12</sub> serán también mayores, como hemos demostrado.

Por otro lado, sabemos que las cifras de creatinina plasmática varían con la edad, esto es, con la cantidad de masa muscular y por tanto, a mayor edad, mayores niveles de creatinina plasmática<sup>87</sup>. Además, sabemos que a mayor edad, menor adherencia al tratamiento dietético, es decir, menor consumo de suplementos<sup>66,67</sup>, tal y como nosotros mismos hemos comprobado. Ello nos permite explicar las correlaciones negativas entre la creatinina plasmática y los niveles de vitamina D ( $-0,39$ ,  $p=0,019$ ), Vitamina B<sub>12</sub> ( $-0,35$ ,  $p=0,003$ ) y GOT ( $-0,54$ ,  $p=0,001$ ): a mayor edad, menor adherencia dietética-consumo de suplementos, menor aporte vitamínico y menor sobrecarga hepática. Y de la misma manera, a menor consumo de suplementos, y mayor consumo de proteínas naturales, mayores niveles de ácido úrico, colesterol y prealbúmina (correlaciones positivas con la creatinina:  $0,44$ ;  $0,33$  y  $0,72$  respectivamente, con  $p<0,05$ )

Según nuestra hipótesis, ya hemos explicado cómo en los pacientes PKU que realizan un tratamiento dietético estricto, con altos aportes de suplementos enriquecidos, los niveles de Cr estarían bajos, y con ellos, los de su metabolito creatinina (tal y como hemos comentado anteriormente).

De nuestra observación, podría deducirse que otro de los metabolitos que podría servir como marcador del cumplimiento dietético es la creatinina plasmática. Si los pacientes incumplen la dieta, y consumen más proteínas naturales y menos suplementos, la creatinina aumentaría al mismo tiempo que aumenta la Phe; al hallar una correlación positiva entre los dos metabolitos, podemos considerar que esta hipótesis es acertada. La determinación de la creatinina plasmática puede realizarse mediante un análisis de laboratorio rutinario de forma rápida y poco costosa, lo que le añadiría valor como posible sistema de control de adherencia al tratamiento, considerado siempre de forma conjunta con el gold estándar, la determinación de Phe.

De la misma manera, si existe un mal control dietético, y se ingieren proteínas naturales al mismo tiempo que los suplementos, en la medida que se elevan la Phe y la creatinina, la deficiencia de Arg se hará más evidente (correlación negativa), la trans-sulfuración será mayor, y los niveles de Cys también.

Desde otro punto de vista, podemos utilizar la misma creatinina como indicador de la severidad de la PKU. Las formas más leves, es decir, aquellas en las que es posible un mayor consumo de proteínas totales y de proteínas naturales, tienen menores niveles de creatinina plasmática (correlación negativa). Lo mismo ocurre en el caso de la mediana de Phe en el último año o de la Phe de control; si sus cifras son bajas, las de creatinina también lo serán (correlación positiva).

## **6.5. NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS**

En base a nuestros resultados, nos cabe pensar que los pacientes PKU a tratamiento dietético podrían beneficiarse de la administración de suplementos de metionina, con lo que aumentarían los niveles de homocisteína y ello podría suponer una menor alteración o incluso una normalización de la vía de la metilación. De la misma manera, otra posible nueva vía terapéutica sería la administración de suplementos de creatina, presente en la leche materna pero no

en los suplementos dietéticos que reciben los pacientes PKU. Ambas hipótesis merecen un estudio independiente que excede los objetivos de nuestro trabajo.

## 6.6. SESGOS Y LIMITACIONES

Este estudio ha sido realizado en la población del área Norte de España (Galicia y País Vasco), en pacientes PKU diagnosticados en su inmensa mayoría mediante el cribado neonatal, de distintos rangos de edad y con un adecuado cumplimiento dietético. El tamaño muestral fue calculado en base a la casuística de nuestros centros y al empleado en otros estudios que encontraron diferencias significativas en el análisis de metabolitos relacionados con la metilación. Con todo, no deja de tratarse de un estudio transversal aunque fuera planificado de forma prospectiva, siendo necesaria la realización de un estudio prospectivo, con mayor número de pacientes en cada grupo de edad y sobre todo respondedores a  $\text{BH}_4$ , así como de distintas áreas geográficas tanto a nivel nacional como internacional, para evitar los sesgos derivados de condicionantes genéticos y culturales (hábitos dietéticos, estilo de vida, etc).

A la vista de los datos de nuestro estudio podemos concluir que el tratamiento dietético y nutricional en los pacientes PKU, como consecuencia de la restricción proteica y el aporte excesivo de fólico y  $\text{B}_{12}$  que contienen los productos dietéticos empleados para estos pacientes, condiciona un aumento de las vías de trans-sulfuración y remetilación que consume grupos metilo de forma que no pueden ser empleados en otras reacciones, generando así un déficit de producción de ADMA y Cr/Crn, hecho sugerido en algún estudio previo, pero no demostrado hasta ahora. Además del control de fenilalanina, la determinación de Crn que se analiza fácilmente en muchos laboratorios y las determinaciones de ADMA y SDMA podrían ser también de utilidad para la monitorización de la adherencia dietética de estos pacientes. Por otra parte, el tratamiento con  $\text{BH}_4$ , al permitir una dieta más libre en proteínas naturales y un menor consumo de producto dietético especial libre de Phe, parece alterar en menor medida la vía de la metilación y ello le supone un valor añadido a su indicación.





## **7. CONCLUSIONES**



## 7. CONCLUSIONES

- 1- En nuestra muestra existe una buena correlación genotipo-fenotipo, con pacientes portadores de mutaciones nulas que muestran altos niveles de concordancia con los fenotipos más graves, tal y como ha sido publicado en algunos estudios previos.
- 2- El aporte proteico y el control de los niveles de Phe es adecuado según los estándares recomendados en la mayoría de nuestros pacientes PKU. La ingesta de proteínas totales de los pacientes PKU es un 117% de la CDR, de ellas, las proteínas naturales suponen un 48% de la CDR, excepto en los pacientes responsivos a  $BH_4$  que reciben como cabría esperar un aporte mayor de proteínas naturales. La mediana de Phe en el último año es adecuada en la práctica totalidad de la muestra, salvo en 8 de los 15 pacientes mayores de 10 años no tratados con  $BH_4$ , que tienen niveles de Phe por encima de lo recomendado.
- 3- A pesar de lo anterior, los pacientes PKU presentan un desarrollo estatural inferior a la población de referencia, presentando un Z-score de talla de -0,8. En cuanto al IMC, el 41,5% de los pacientes presentan sobrepeso y ningún paciente es obeso. Además, un porcentaje significativo de pacientes presenta valores de prealbúmina inferiores a 21 mg/dL (60,7%), concentraciones de selenio inferiores a 60  $\mu$ g/L (35%), de LDL-colesterol inferiores a 39 mg/dL (60%) y de HDL-colesterol inferiores a 30 mg/dL (13%). En cuanto a la vitamina D, un 13,5% de los pacientes PKU presentan una insuficiencia moderada.
- 4- Aunque los niveles están más normalizados, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los niveles prealbúmina, selenio, vitamina D ni colesterol fraccionado al estratificar la muestra en función del tratamiento con  $BH_4$ , probablemente como consecuencia del número de pacientes que reciben esta terapia.

- 5- Los valores de ácido fólico y de vitamina B<sub>12</sub> de los pacientes PKU de nuestra muestra se encuentran significativamente elevados con respecto a la población de referencia, mientras que en los pacientes respondedores a BH<sub>4</sub>, los valores de ambos micronutrientes se acercan más al rango de normalidad.
- 6- Al analizar lo que ocurre con el perfil de aminoácidos, vemos que el 48% de los pacientes PKU presentan unos valores de Hcy muy inferiores al rango de referencia, así como una disminución en los niveles de Met, Arg y Citr, lo que indica un aumento de la vía de la remetilación. Por otro lado, los niveles de Cys están elevados, así como de los aminoácidos que dependen de la Arg para su metabolismo (Gly y Orn) lo que indica un aumento de la trans-sulfuración.
- 7- La restricción proteica propia de la dieta de los pacientes PKU, unida al excesivo aporte de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> de sus suplementos, ocasionan una alteración de la vía de la metilación en los pacientes PKU, al aumentar tanto la vía de la trans-sulfuración como de la remetilación. Esto supone un consumo de grupos metilo que no pueden emplearse en otras reacciones, lo que se traduce en una disminución en la producción de ADMA, SDMA, Creatina y Creatinina, tal y como hemos demostrado.
- 8- El tratamiento con BH<sub>4</sub>, al permitir una dieta más libre en proteínas naturales y un menor aporte de suplementos, debería condicionar una menor alteración en la metilación; si bien las cifras de ADMA, SDMA y Creatinina en los pacientes tratados con BH<sub>4</sub> se aproximan más al rango de referencia, no hallamos diferencias estadísticamente significativas.
- 9- Las determinaciones de ADMA y Crn plasmática pueden ser útiles como marcadores indirectos del cumplimiento dietético por parte de los pacientes. Esto es especialmente importante en el caso de la Crn plasmática, ya que se trata de una determinación que puede realizarse de forma estándar en un análisis de laboratorio ordinario y con un coste bajo.

10-Nuestros resultados ponen por primera vez de manifiesto las alteraciones de la vía de la metilación en pacientes PKU y su relación con el tratamiento dietético, en especial en el caso de la Arg-GAA-Cr, que no había sido previamente estudiada en esta enfermedad. En base a nuestros resultados, consideramos que nuevas líneas de investigación de cara al tratamiento de la PKU podrían ser la administración de suplementos de metionina y/o de creatina.







## **8. BIBLIOGRAFÍA**





## 8. BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> Blau N, Thöny B. Tetrahydrobiopterine in biomedical research. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32: 1-2.
- <sup>2</sup> Centerwall SA, Centerwall WR. The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. *Pediatrics* 2000; 105: 89-103.
- <sup>3</sup> Christ SE. Asbjorn Folling and the discovery of phenylketonuria. *J Hist Neurosci* 2003; 12: 44-54.
- <sup>4</sup> Fölling I. The discovery of phenylketonuria. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 407: 4-10.
- <sup>5</sup> Penrose L, Quastel JH. Metabolic studies in phenylketonuria. *Biochem J* 1937; 31: 266-74.
- <sup>6</sup> Jervis GA. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953; 82: 514-5.
- <sup>7</sup> Jervis GA. Studies on phenylpyruvic oligophrenia; the position of the metabolic error. *J Biol Chem* 1947; 169: 651-6.
- <sup>8</sup> Woolf LI, Griffiths R, Moncrieff A, Coates S, Dillistone F. The dietary treatment of phenylketonuria. *Arch Dis Child* 1958; 33: 31-45.
- <sup>9</sup> Woolf LI, Vulliamy DG. Phenylketonuria with a study of the effect upon it of glutamic acid. *Arch Dis Child* 1951; 26: 487-94.
- <sup>10</sup> Levy HL. Phenylketonuria: old disease, new approach to treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 1811-3.
- <sup>11</sup> Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 1953; 265: 812-3.
- <sup>12</sup> Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenyl-ketonuric child. *Acta Paediatr* 1954; 43: 64-77.
- <sup>13</sup> Dhondt JL. Neonatal screening: from the 'Guthrie age' to the 'genetic age'. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 418-22.
- <sup>14</sup> Guthrie R. The introduction of newborn screening for phenylketonuria. A personal history. *Eur J Pediatr* 1996; 155 Suppl 1: S4-5.
- <sup>15</sup> Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963; 32: 338-43.
- <sup>16</sup> Wilson JMG, Jungner G. Principles and Practice of Screening for Disease. World Health Organization Public Health Papers, No. 34; 1968. [http://whqlibdoc.who.int/php/WHO\\_PHP\\_34.pdf](http://whqlibdoc.who.int/php/WHO_PHP_34.pdf).
- <sup>17</sup> Udenfried S, Cooper JR. The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J Biol Chem* 1952; 194: 503-11.

- <sup>18</sup> Kaufman S. The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J Biol Chem* 1957; 226: 511-24.
- <sup>19</sup> Friedman PA, Fisher DB, Kang ES, Kaufman S. Detection of hepatic phenylalanine 4-hydroxylase in classical phenylketonuria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973; 70: 552-6.
- <sup>20</sup> Speer A, Bollman R, Michel A, Neumann R, Bommer C, Hanke R et al. Prenatal diagnosis of classical phenylketonuria by linked restriction fragment length polymorphism analysis. *Prenat Diagn* 1986; 6: 447-50.
- <sup>21</sup> Curso de Formación en Enfermedades Raras Metabólicas, 2ª edición (2010).
- <sup>22</sup> Requejo AM, Ortega RM. Proteínas y aminoácidos. En: Tojo R, editor. *Tratado de nutrición pediátrica*. 1ª edición. Barcelona: Doyma; 2001. p.101-117.
- <sup>23</sup> Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet* 2010; 376: 1417-27.
- <sup>24</sup> Couce ML, Castiñeiras DE, Bóveda MD, Baña A, Cocho JA, Iglesias AJ, et al. Evaluation and long-term follow-up of infants with inborn errors of metabolism identified in an expanded screening programme. *Mol Genet Metab* 2011; 104: 470-5.
- <sup>25</sup> Erlandsen H, Stevens RC. The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 1999; 68: 103-25.
- <sup>26</sup> Feillet F, van Spronsen FJ, MacDonald A, Trefz FK, Demirkol M, Giovannini M, et al. Challenges and pitfalls in the management of phenylketonuria. *Pediatrics* 2010; 126: 333-41.
- <sup>27</sup> Woo SL, Lidsky AS, Güttler F, Chandra T, Robson KJ. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature* 1983; 306: 151-155.
- <sup>28</sup> Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U, Lichter-Konecki U. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol Genet Metab* 2011;104 Suppl: S2-9.
- <sup>29</sup> Kwok S, Ledley FD, Robson JH, Woo SLC. Nucleotide sequence of a full-length DNA clone of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 1985; 24: 556-561.
- <sup>30</sup> Kobe B, Jennings IG, House CM, Michell BJ, Goodwill KE, Santarsiero BD, et al. Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nat Struct Biol* 1999; 6: 442-448.
- <sup>31</sup> Fusetti F, Erlandsen H, Flatmark T, Stevens RC. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J Biol Chem* 1998; 273: 16962-16967.
- <sup>32</sup> Erlandsen H, Stevens RC. The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 1999; 68: 103-125.
- <sup>33</sup> Konecki D, Lichter-Konecki U. (2001) GenBank AF4044777.

- <sup>34</sup> Scriver CR, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. En: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, editores. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8ª edición. New York: McGraw-Hill; 2001. p 1667-1724.
- <sup>35</sup> Couce ML, Bóveda MD, Fernández-Marmiesse A, Mirás A, Pérez B, Desviat LR, et al. Molecular epidemiology and BH4-responsiveness in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency from Galicia region of Spain. *Gene* 2013; 25; 521: 100-4.
- <sup>36</sup> Correcher Medina P, Pedrón Marzal G, Rey Simón R, Calvo Rigual F. Venopunción en el dorso de la mano. ¿Una alternativa a la punción del talón?. *An Pediatr (Barc)* 2012; 77: 381-385.
- <sup>37</sup> Couce ML, Castiñeiras DE, Bóveda MD, Baña A, Cocho JA, Iglesias AJ, et al. Evaluation and long-term follow-up of infants with inborn errors of metabolism identified in an expanded screening programme. *Mol Genet Metab* 2011; 104: 470-5.
- <sup>38</sup> Curso online de cribado neonatal en endocrinometabólicas, organizado por la FAPAP.
- <sup>39</sup> Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 1999; 135: 375-378.
- <sup>40</sup> Arai N, Narisaya K, Hayakawa H, Tada K. Hyperphenylalaninemia due to dihydropterine reductase deficiency: diagnosis by enzyme assay on dried blood spots. *Pediatrics* 1982; 98: 426-430.
- <sup>41</sup> Blau N, Blaskovics ME. Hyperphenylalaninemia. En: Nenad Blau, Marinus Duran, Milan E, Blaskovics, editores. *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. 1ª edición. Londres: Chapman & Hall Medical; 1996. p 65-78.
- <sup>42</sup> Blau N, Thöny B, Cotton RGH, Hyland K. Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. En: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, B. Childs, B. Vogelstein, editores. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 2012, p 1725-1776.
- <sup>43</sup> Opladen T, Abu Seda B, Rassi A, Thöny B, Hoffmann GF, Blau N. Diagnosis of tetrahydrobiopterin deficiency using filter paper blood spots: further development of the method and 5 years experience. *J Inher Metab Dis* 2011; 34: 819-826.
- <sup>44</sup> Martínez-Pardo M, Marchante C, Dalmau J, Pérez M, Bellón C. Protocolo de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las hiperfenilalaninemias. *An Esp Pediatr Suppl* 1998; 114: 3-8.
- <sup>45</sup> Mena MA, Aguado EG, Yébenes JG. Monoamine metabolites in human cerebrospinal fluid. HPLC/ED method. *Acta Neurol Scand* 1984; 69: 218-225.

- <sup>46</sup> Jäggi L, Zurflüh MR, Schuler A, Ponzone A, Porta F, Fiori L, et al. Outcome and long-term follow-up of 36 patients with tetrahydrobiopterin deficiency. *Mol Genet Metab* 2008; 93: 295–305.
- <sup>47</sup> Muntau A. C, Röschinger W, Habich M, Demmelmair H, Hoffmann B, Sommerhoff CP, et al. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med* 2002; 347: 2122–2132
- <sup>48</sup> Burton BK, Grange DK, Milanowski A, Vockley G, Feillet F, Crombez EA, et al. The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study. *J. Inherit Metab Dis* 2007; 30: 700–707.
- <sup>49</sup> Nielsen JB, Nielsen KE, Güttler F. Tetrahydrobiopterin responsiveness after extended loading test of 12 Danish PKU patients with the Y414C mutation. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33: 9–16.
- <sup>50</sup> Desviat LR, Pérez B, Bélanger-Quintana A, Castro M, Aguado C, Sánchez A, et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype. *Mol Genet Metab* 2004; 83: 157–162.
- <sup>51</sup> Blau N, Belanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A, et al. Optimizing the use of sapropterin (BH(4)) in the management of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2009; 96: 158 – 163.
- <sup>52</sup> Campistol J, Lambruschini, N, Gómez-López, L, Gutierrez A, Fusté E, Vilaseca M.A. Hiperfenilalaninemias. En: Sanjurjo P, Baldellou A, editores. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 3ª edición. Majadahonda: Ergon; 2010. p 423–439.
- <sup>53</sup> Acosta PB, Yannicelli S, Singh R, Mofidi S, Steiner R, DeVincentis E, et al. Nutrient intakes and physical growth of children with phenylketonuria undergoing nutrition therapy. *J Am Diet Assoc* 2003; 103: 1167–1173.
- <sup>54</sup> MacDonald A, Rocha JC, van Rijn M, Feillet F. Nutrition in phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2011; 104 Suppl: S10-8.
- <sup>55</sup> van Spronsen FJ, Enns GM. Future treatment strategies in phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2010; 99 Suppl 1: S90-5.
- <sup>56</sup> Cockburn F, Barwel BE, Brenton P, Chaple J, Clark B, Curzon G et al. Recommendations on the dietary management of phenylketonuria. Report of Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria. *Arch Dis Child* 1993; 68:4 26-427.
- <sup>57</sup> Burgard P, Bremer HJ, Buhrdel P. Rationale for the German recommendations for phenylalanine level control in phenylketonuria 1997. *Eur J Pediatr* 1999; 158: 46-54.

- <sup>58</sup> AECOM. Guía práctica para el diagnóstico, tratamiento y registro de pacientes con hiperfenilalaninemia en España. Servicios Editoriales SL, Madrid 2011; pp1-120.
- <sup>59</sup> Belanger-Quintana A, Burlina A, Harding CO, Muntau AC. Up to date knowledge on different treatment strategies for phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2011; 104 Suppl: S19-25.
- <sup>60</sup> Somaraju UR, Merrin M. Sapropterin dihydrochloride for phenylketonuria. The Cochrane database of systematic reviews. 2012; 12: CD008005.
- <sup>61</sup> Hegge KA, Horning KK, Peitz GJ, Hegge K. Sapropterin: a new therapeutic agent for phenylketonuria. *Ann Pharmacother* 2009; 43: 1466-73.
- <sup>62</sup> Fiege B, Blau N. Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in phenylketonuria. *J Pediatr* 2007; 150: 627-30.
- <sup>63</sup> Ney DM, Blank RD, Hansen KE. Advances in the nutritional and pharmacological management of phenylketonuria. *Curr Opin Clin Nutr* 2014; 17: 61-8.
- <sup>64</sup> van Calcar SC1, MacLeod EL, Gleason ST, Etzel MR, Clayton MK, Wolff JA, et al. Improved nutritional management of phenylketonuria by using a diet containing glycomacropeptide compared with amino acids. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 1068-77.
- <sup>65</sup> Ruddick JP1, Evans AK, Nutt DJ, Lightman SL, Rook GA, Lowry CA. Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev Mol Med*. 2006; 8: 1-27.
- <sup>66</sup> van Spronsen FJ, Huijbregts SC, Bosch AM, Leuzzi V. Cognitive, neurophysiological, neurological and psychosocial outcomes in early-treated PKU-patients: a start toward standardized outcome measurement across development. *Mol Genet Metab* 2011;104 Suppl: S45-51.
- <sup>67</sup> Demirkol M, Gizewska M, Giovannini M, Walter J. Follow up of phenylketonuria patients. *Mol Genet Metab* 2011; 104 Suppl: S31-9.
- <sup>68</sup> Aldámiz-Echevarría L, Bueno MA, Couce ML, Lage S, Dalmau J, Vitoria I, et al. Anthropometric characteristics and nutrition in a cohort of PAH-deficient patients. *Clin Nutr* 2014; 33: 702-17.
- <sup>69</sup> Aldámiz-Echevarría L, Bueno MA, Couce ML, Lage S, Dalmau J, Vitoria I, et al. Tetrahydrobiopterin therapy vs phenylalanine-restricted diet: Impact on growth in PKU. *Mol Genet Metab* 2013; 109: 331-38.
- <sup>70</sup> Aldámiz-Echevarría L, Bueno MA, Couce ML, Lage S, Dalmau J, Vitoria I, et al. 6R-tetrahydrobiopterin treated PKU patients below 4 years of age: Physical outcomes, nutrition and genotype. *Mol Genet Metab* 2015; 115: 10-6.

- <sup>71</sup> Couce ML, Guler I, Anca-Couce A, Lojo M, Mirás A, Leis R, et al. New insights in growth of phenylketonuric patients. *Eur J Pediatr* 2015; 174: 651-9.
- <sup>72</sup> Hennermann JB, Roloff S, Gellermann J, Vollmer I, Windt E, Vetter B, et al. Chronic kidney disease in adolescent and adult patients with phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 2013; 36: 747-56.
- <sup>73</sup> Miras A, Boveda MD, Leis MR, Mera A, Aldamiz-Echevarria L, Fernandez-Lorenzo JR, et al. Risk factors for developing mineral bone disease in phenylketonuric patients. *Mol Genet Metab*. 2013; 108: 149-54.
- <sup>74</sup> Mirás A, Freire Corbacho A, Rodriguez García J, Leis R, Aldamiz-Echevarria L, Fraga JM, et al. Utilidad de los marcadores de remodelado óseo en la detección de enfermedad mineral ósea en pacientes con fenilcetonuria. *Med Clin (Barc)* 2015; 144: 193-7.
- <sup>75</sup> Dokoupil K, Gokmen-Ozel H, Lammardo AM, Motzfeldt K, Robert M, Rocha JC, et al. Optimising growth in phenylketonuria: current state of the clinical evidence base. *Clin Nutr*. 2012; 31: 16-21.
- <sup>76</sup> Arnold GL, Vladutiu CJ, Kirby RS, Blakely EM, Deluca JM. Protein insufficiency and linear growth restriction in phenylketonuria. *J Pediatr* 2002; 141: 243-6.
- <sup>77</sup> Schulpis KH, Karikas GA, Papakonstantinou E. Homocysteine and other vascular risk factors in patients with phenylketonuria on a diet. *Acta Paediatr* 2002; 91: 905-9.
- <sup>78</sup> Couce Pico ML, Fernández Lorenzo JR, Fraga Bermúdez JM. Trastorno del metabolismo de los aminoácidos azufrados. En: Sanjurjo P, Baldellou A, editores. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 4ª edición. Madrid: Ergón; 2014, p 509-518.
- <sup>79</sup> Gutierrez-Aguilar G, Abenia-Uson P, García-Cazorla A, Vilasec MA, Campistol J. Encefalopatía con aciduria metilmalónica y homocistinuria secundaria a un suministro exógeno deficiente de vitamina B<sub>12</sub>. *Rev Neurol* 2005; 40: 605-8.
- <sup>80</sup> Refsum H, Fiskerstrand T, Guttormsen AB, Ueland PM. Assessment of homocysteine status. *J Inher Metab Dis* 1997; 20: 286-94.
- <sup>81</sup> Campistol J. Errores congénitos del metabolismo intermediario con repercusión neurológica. Aminoacidopatías. Acidurias orgánicas. En: Glaxo Welcome, editor. Neurología Pediátrica. 1ª edición. Madrid: Ergón; 2000. p 95-113.
- <sup>82</sup> Galan A, Formiguera X, Rey-Joly C. Dimetilarginina asimétrica como marcador de riesgo cardiovascular. *Med Clin (Barc)* 2008; 131: 271-5.
- <sup>83</sup> Blackwell S. The biochemistry, measurement and current clinical significance of asymmetric dimethylarginine. *Ann Clin Biochem* 2010; 47: 17-28.
- <sup>84</sup> Tain YL, Huang LT. Asymmetric dimethylarginine: clinical applications in pediatric medicine. *J Formos Med Assoc* 2011; 110: 70-7.

- <sup>85</sup> Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, et al. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 2000; 87: 99-105.
- <sup>86</sup> Landim MB, Casella Filho A, Chagas AC. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelial dysfunction: implications for atherogenesis. *Clinics* 2009; 64: 471-8.
- <sup>87</sup> Kanzelmeyer N, Tsikas D, Chobanyan-Jurgens K, Beckmann B, Vaske B, Illsinger S, et al. Asymmetric dimethylarginine in children with homocystinuria or phenylketonuria. *Amino Acids* 2012; 42: 1765-72.
- <sup>88</sup> Huemer M, Simma B, Mayr D, Moslinger D, Muhl A, Schmid I, et al. Free asymmetric dimethylarginine (ADMA) is low in children and adolescents with classical phenylketonuria (PKU). *J Inherit Metab Dis* 2012; 35: 817-21.
- <sup>89</sup> Ozcan O, Ipcioglu OM, Gultepe M. Unexpectedly low asymmetric dimethylarginine (ADMA) and homocysteine levels in patients with phenylketonuria(PKU). *J Inherit Metab Dis.* 2012; 35: 1153.
- <sup>90</sup> Sanayama Y, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, et al. Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2011; 103: 220-5.
- <sup>91</sup> Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 2000; 80: 1107-1213.
- <sup>92</sup> Tachikawa M, Fukaya M, Terasaki T, Ohtsuki S, Watanabe M. Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases uCK-Mi and CK-B suggest a novel neuron-glial relationship for brain energy homeostasis. *Eur J Neurosci* 2004; 20: 144-160.
- <sup>93</sup> Béard E, Braissant O. Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. *J Neurochem* 2010; 115: 297-313.
- <sup>94</sup> Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 2009; 37: 153-68.
- <sup>95</sup> WHO, Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *World. Health. Organ. Tech. Rep. Ser.* 1995; 854: 1-452.
- <sup>96</sup> WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta. Paediatr.* 2006; 450: S76-85.
- <sup>97</sup> Carrascosa A, Fernández JM, Fernández C, Fernández A, López-Siguero JP, Sánchez E, et al. Estudios españoles de crecimiento 2008. Nuevos patrones antropométricos. *Endocrinol Nutr* 2008; 55: 484-506.

- <sup>98</sup> Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP, et al. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 1377-83.
- <sup>99</sup> Andrade F, Llarena M, Lage S, Aldámiz-Echevarría L. Quantification of arginine and its methylated derivatives in healthy children by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* 2015; 53: 787-92.
- <sup>100</sup> Vugteveen I, Hoeksma M, Monsen AL, Fokkema MR, Reijngoud DJ, van Rijn M, et al. Serum vitamin B12 concentrations within reference values do not exclude functional vitamin B12 deficiency in PKU patients of various ages. *Mol Genet Metab* 2011; 102: 13-17.
- <sup>101</sup> Guldborg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, François B, Michiels L, et al. European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype- based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 71-79.
- <sup>102</sup> Daniele A, Scala I, Cardillo G, Pennino C, Ungaro C, Sibilio M, et al. Functional and structural characterization of novel mutations and genotype-phenotype correlation in 51 phenylalanine hydroxylase deficient families from Southern Italy. *FEBS J.* 2009; 276: 2048-2059.
- <sup>103</sup> Desviat LR, Pérez B, Gámez A, Sánchez A, García MJ, Martínez-Pardo M, et al. Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 386-392.
- <sup>104</sup> Trefz FK, Scheible D, Götz H, Frauendienst-Egger G. Significance of genotype in tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. *J Inher Metab Dis.* 2009; 32: 22-26.
- <sup>105</sup> Zurflüh MR, Zschocke J, Lindner M, Feillet F, Chery C, Burlina A, et al. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* 2008; 29: 167-75.
- <sup>106</sup> Özgüç M, Özalp I, Coşkun T, Yılmaz E, Erdem H, Ayter S. Mutation analysis in Turkish phenylketonuria patients. *J Med Genet* 1993; 30, 129-130.
- <sup>107</sup> Rivera I, Mendes D, Afonso A, Barroso M, Ramos R, Janeiro P, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency: molecular epidemiology and predictable BH4-responsiveness in South Portugal PKU patients. *Mol Genet Metab* 2011; 104, S86-S92.
- <sup>108</sup> Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Kalogerakou M, Soulpi K, Missiou-Tsangaraki, S, Kattamis C. Preliminary mutation analysis in the phenylalanine hydroxylase gene in Greek PKU and HPA patients. *Hum. Genet* 1994; 94, 573-575.



- <sup>109</sup> Enns GM, Koch R, Brumm V, Blakely E, Suter R, Jurecki E. Suboptimal outcomes in patients with PKU treated early with diet alone: revisiting the evidence. *Mol Genet Metab* 2010; 101: 99-109.
- <sup>110</sup> Dobbelaere D, Michaud L, Debrabander A, Vanderbecken S, Gottrand F, Turck D, et al. Evaluation of nutritional status and pathophysiology of growth retardation in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26: 1-11.
- <sup>111</sup> Van der Schot LW, Doesburg WH, Sengers RC. The phenylalanine response curve in relation to growth and mental development in the first year of life. *Acta Paediatr* 1994; 407: S68-S9.
- <sup>112</sup> Verkerk PH, van Spronsen FJ, Smit GP, Sengers RC. Impaired prenatal and postnatal growth in Dutch patients with phenylketonuria. The National PKU Steering Committee. *Arch Dis Child* 1994; 71: 114-18.
- <sup>113</sup> Belanger-Quintana A, Martínez-Pardo. Physical development in patients with phenylketonuria on dietary treatment: a retrospective study. *Mol Genet Metab* 2011; 104: 480-4.
- <sup>114</sup> Huemer M, Huemer C, Möslinger D, Huter D, Stöckler-Ipsiroglu S. Growth and body composition in children with classical phenylketonuria: results in 34 patients and review of the literature. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 694-9.
- <sup>115</sup> Macleod EL, Ney DM. Nutritional Management of Phenylketonuria. *Ann Nestle Eng* 2010; 68: 58-69.
- <sup>116</sup> Singh RH, Quirk ME, Douglas TD, Brauchla MC. BH(4) therapy impacts the nutrition status and intake in children with phenylketonuria: 2-year follow-up. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33: 689-95.
- <sup>117</sup> Couce ML, Guler I, Anca-Couce A, Lojo M, Mirás A, Leis R, et al. New insights in growth of phenylketonuric patients. *Eur J Pediatr* 2015; 174: 651-9.
- <sup>118</sup> White JE, Kronmal RA, Acosta PB. Excess weight among children with phenylketonuria. *J Am Coll Nutr* 1982; 1: 293-303.
- <sup>119</sup> Burrage LC, McConnell J, Haesler R, O'Riordan MA, Sutton VR, Kerr DS, et al. High prevalence of overweight and obesity in females with phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2012; 107: 43-8.
- <sup>120</sup> Scaglioni S, Verduci E, Fiori L. Body mass index rebound and overweight at 8 years of age in hyperphenylalaninaemic children. *Acta Paediatr* 2004; 93: 1596e.
- <sup>121</sup> Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, Fiori L, Riva E. Phenylketonuria: dietary and therapeutic challenges. *J Inherit Metab Dis* 2006; 30: 145-52.

- <sup>122</sup> Rose HJ, White F, Macdonald A, Rutherford PJ, Favre E. Fat intakes of children with PKU on low phenylalanine diets. *J Hum Nutr Diet* 2005; 18: 395-400.
- <sup>123</sup> Singh RH, Quirk ME, Douglas TD, Brauchla MC. BH(4) therapy impacts the nutrition status and intake in children with phenylketonuria: 2-year follow-up. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33: 689-695.
- <sup>124</sup> Hanley WB, Feigenbaum A, Clarke JT, Schoonheydt W, Austin V. Vitamin B<sub>12</sub> deficiency in adolescents and young adults with phenylketonuria. *Lancet* 1993; 342: 997.
- <sup>125</sup> Wiig I, Motzfeldt K, Løken EB, Kase BF. Nutritional consequences of adhering to a low phenylalanine diet for late-treated adults with PKU: low Phe diet for adults with PKU. *JIMD Rep* 2013; 7: 109-116.
- <sup>126</sup> Evans S, Daly A, MacDonald J, Preece MA, Santra S, Vijay S, et al. The micronutrient status of patients with phenylketonuria on dietary treatment: an ongoing challenge. *Ann Nutr Metab* 2014; 65: 42-48.
- <sup>127</sup> Knerr I, Blessing H, Seyferth S, Watling RJ, Chaudhri MA. Evaluation of plasma trace element and mineral status in children and adolescents with phenylketonuria using data from inductively-coupled-plasma atomic emission and mass spectrometric analysis. *Ann Nutr Metab* 2013; 63: 168-173.
- <sup>128</sup> Lammardo AM, Robert M, Rocha JC, vanRijn M, Ahring K, Bélanger-Quintana A, et al. Main issues in micronutrient supplementation in phenylketonuria, *Mol. Genet. Metab* 2013; 110: S1-S5.
- <sup>129</sup> Crujeiras V, Aldámiz-Echevarría L, Dalmau J, Vitoria I, Andrade F, Roca I, et al. Vitamin and mineral status in patients with hyperphenylalaninemia. *Mol Genet Metab* 2015; 115: 145-50.
- <sup>130</sup> Arnold G, Kirby R, Preston C, Blakely E. Iron and protein sufficiency and red cell indices in phenylketonuria. *J Am Coll Nutr* 2001; 20: 65-70.
- <sup>131</sup> Campistol J, Lambruschini N, Castejón P, Gutiérrez A, Fusté E, Gassió R, Vilaseca MA. Hiperfenilalaninemia. En: Sanjurjo P, Baldellou A, editores. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. 4ª edición. Madrid: Ergón; 2014, p 455-477.
- <sup>132</sup> Castillo M, Zafra MF, García-Pergrín E. Inhibition of brain and liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase in experimental hyperphenylalaninemia. *Neurochem Res* 1988; 33: 551-5.
- <sup>133</sup> Colomé C, Artuch R, Lambruschini N, Cambra FJ, Campistol J, Vilaseca MA. Is there a relationship between plasma phenylalanine and cholesterol in phenylketonuric patients under dietary treatment? *Clin Biochem* 2001; 33: 373-6.

- <sup>134</sup> Shefer S, Tint GS, Jean-Guillaume D. Is there a relationship between 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and forebrain pathology in the PKU mouse? *J Neurosci Res* 2000; 61: 549-63.
- <sup>135</sup> Ribas GS, Sitta A, Wajner M, Vargas CR. Oxidative stress in phenylketonuria: what is the evidence? *Cell Mol Neurobiol* 2011; 31: 653-662.
- <sup>136</sup> Sitta A, Barschak AG, Deon M, Terroso T, Pires R, Giugliani R, et al. Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab Brain Dis* 2006; 21: 287-296.
- <sup>137</sup> Loscalzo J. L-arginine and atherothrombosis. *J Nutr.* 2004; 134: 2798S-2800S.
- <sup>138</sup> Aldámiz-Echevarría L, Andrade F, Llanera M, De las Heras J, Couce ML. Dimethylarginines as biomarkers for the kidney transplant management in methylmalonic aciduria. *Nephrology* 2015; 20: 576-579.
- <sup>139</sup> Lu TM, Chung MY, Lin CC, Hsu CP, Lin SJ. Asymmetric dimethylarginine and clinical outcomes in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 1566-72.
- <sup>140</sup> Abedini S, Meinitzer A, Holme I, Marz W, Weihsrauch G, Fellstrom B, et al. Asymmetrical dimethylarginine is associated with renal and cardiovascular outcomes and all-cause mortality in renal transplant recipients. *Kidney Int* 2010; 77: 44-50.

